

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 687**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2007** **E 12162958 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017** **EP 2484696**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos específicos de hLIGHT antagonistas**

30 Prioridad:

28.08.2006 US 840774 P
25.01.2007 US 897875 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.11.2017

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)
1-6-1, Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP y
LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND
IMMUNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

GRANGER, STEVEN W.;
KATO, SHINICHIRO y
WARE, CARL F.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 643 687 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

Anticuerpos monoclonales humanos específicos de hLIGHT antagonistas.

5 **Introducción**

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido LIGHT humano (hLIGHT) (de tipo linfotóxica, muestra expresión inducible y compete con la glucoproteína D del VHS para HVEM, un receptor expresado por los linfocitos T), con un fragmento del polipéptido hLIGHT o con otro epítipo de hLIGHT. En algunas formas de realización, los anticuerpos son anticuerpos totalmente humanos, preferentemente anticuerpos monoclonales totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, fragmento de polipéptido hLIGHT o epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además ácidos nucleicos aislados codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, fragmento de polipéptido hLIGHT o epítipo de hLIGHT. La invención proporciona además vectores y células hospedadoras según las reivindicaciones que comprenden ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, fragmento de polipéptido hLIGHT o epítipo de hLIGHT, así como métodos de preparación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, fragmento de polipéptido hLIGHT o epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además métodos de utilización de los anticuerpos anti-hLIGHT proporcionados en la presente memoria para inhibir la actividad biológica de hLIGHT *in vivo* y/o para tratar o de otro modo controlar una enfermedad mediada por hLIGHT en el paciente.

Antecedentes

El LIGHT (de tipo linfotóxica, muestra expresión inducible y compete con la glucoproteína D del VHS para HVEM, un receptor expresado por los linfocitos T) es una potencial diana de citocina que se cree participa en los procesos de las enfermedades autoinmunitarias inflamatorias crónicas (Mauri *et al.*, *Immunity* 8:21-30, 1998). Como miembro de la superfamilia de FNT (SFFNT) de ligandos, LIGHT también se conoce como SFFNT14 o CD258. LIGHT se expresa sobre la superficie de las células T con la activación de una manera regulada estrechamente que aparece dentro de las primeras 4 horas, alcanzando un máximo a las 12-24 horas y desapareciendo en 48 horas (Castellano *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:42841-51, 2002). Sin embargo, LIGHT también se encuentra presente a niveles detectables constitutivamente sobre la superficie de las células dendríticas inmaduras (Tamada *et al.*, *J. Immunol.* 164:4105-10, 2000) y sobre las células T y las células asesinas naturales (NK) del intestino (Cohavy *et al.*, *J. Immunol.* 174:646-53, 2005). LIGHT media sus efectos biológicos mediante la unión a tres receptores de la superfamilia de FNT, incluyendo el receptor de la linfotóxica β (RLT β) (Crowe *et al.*, *Science* 264:707-10, 1994; Browning *et al.*, *J. Immunol.* 159:3288-98, 1997), el mediador de la entrada del virus del herpes (HVEM) (Montgomery *et al.*, *Cell* 87(3):427-36, 1996) y el receptor señuelo 3 (DcR3) (Yu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:13733-6, 1999).

Los ratones tratados con una proteína de fusión RLT β -Fc inhibidora vieron reducidos los síntomas inflamatorios en el modelo de transferencia de células T CD4⁺CD45RB^{high} de colitis, una patología mediada por las células T CD4⁺ (Mackay *et al.*, *Gastroenterology* 115:1464-75, 1998). La expresión específica de células T transgénica constitutiva de LIGHT también se ha demostrado que conduce a inflamación intestinal severa con una patología de tipo autoinmunitario similar a la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) humana (Wang *et al.*, *J. Immunol.* 174:8173-82, 2005; Shaikh *et al.*, *J. Immunol.* 167:6330-7, 2001; Wang *et al.*, *J. Immunol.* 167:5099-105, 2001; Wang *et al.*, *J. Clin. Invest.* 113:826-35, 2005). Los linfocitos expresantes de LIGHT pueden inducir síntomas similares a la EII (por ejemplo, periles de citocinas de la enfermedad de Crohn humana, úlceras fisurantes, ileitis e incrementos en IFN- γ y FNT colónicas) al transferir células de ganglios linfáticos mesentéricos de animales transgénicos para LIGHT a RAG^{-/-} (Wang *et al.*, *J. Immunol.* 174:8173-82, 2005). En la enfermedad humana, se han observado incrementos de la expresión de LIGHT en pacientes con enfermedad de Crohn activa (Cohavy *et al.*, *J. Immunol.* 174:646-53, 2005; Wang *et al.*, *J. Immunol.* 174:8173-82, 2005; Wang *et al.*, *J. Clin. Invest.* 113:826-35, 2004; Cohavy *et al.*, *J. Immunol.* 173:251-8, 2004). Se ha demostrado que LIGHT se encuentra elevado en las células T intestinales de los pacientes de EII (Cohavy *et al.*, *J. Immunol.* 173:251-8, 2004). La evidencia genética también apoya el papel de LIGHT en la EII (Granger *et al.*, *J. Immunol.* 167:5122-8, 2001; Rioux *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 66:1863-70, 2000; Low *et al.*, *Inflamm. Bowel Dis.* 10:173-81, 2004; Bonen y Cho, *Gastroenterology* 124:521-36, 2003).

Además, se ha demostrado que la señalización de CCL20-CCR6 participa en la EII y que LIGHT induce la secreción de CCL20 a partir de la línea celular epitelial colónica humana HT29.14s. En estudios humanos, se ha encontrado que células epiteliales del colon son una fuente importante de CCL20 en los pacientes de EII y que la expresión de CCL20 se encuentra incrementada en los pacientes humanos de EII (Kwon *et al.*, *Gut* 51:818-26, 2002; Kaser *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 24:74-85, 2004). El documento nº WO 2003/089575 describe anticuerpos contra TL5 (LIGHT).

También se ha relacionado hLIGHT con la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Por ejemplo, se ha demostrado que LIGHT proporciona una potente actividad coestimuladora a las células T, potenciando la proliferación y la producción de citocinas Th1 independientemente de la ruta de B7-CD28 (ver, por ejemplo,

Tamada *et al.*, J. Immunol. 164:4105-4110, 2000). El bloqueo de la coestimulación de LIGHT-HVEM por anticuerpos monoclonales anti-HVEM, HVEM-Ig o proteína de fusión de RLTβ inhibe las respuestas de células T alogénicas (ver, por ejemplo, Tamada *et al.*, J. Immunol. 164:4105-4110, 2000; Harrop *et al.*, J. Immunol. 161:1786, 1998). Además, la administración *in vivo* de RLTβ-Ig o anticuerpos murinos anti-LIGHT inhibe las respuestas de linfocitos T citotóxicos (LTC) anti-huésped en un modelo de EICH aguda murina (Tamada *et al.*, Nat. Med. 6:283-289, 2000).

Aunque las observaciones, tales como las comentadas anteriormente, señalan a un papel para LIGHT en los trastornos inflamatorios, tales como EII o EICH, hasta hoy no se han producido anticuerpos humanos anti-LIGHT humano ni se ha demostrado que ningún anticuerpo anti-HLIGHT humano o anticuerpo monoclonal anti-HLIGHT humano antagonice la actividad biológica de hLIGHT. De esta manera, sigue existiendo la necesidad de identificar terapias, tales como las terapias anti-LIGHT, que resulten útiles en el tratamiento de los trastornos inflamatorios en el ser humano. La mención o comentario de una referencia en la presente memoria no deberá interpretarse como una admisión de que el mismo sea técnica anterior a la presente invención.

Sumario

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además ácidos nucleicos aislados codificantes de anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además vectores y células hospedadoras que comprenden ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además métodos de preparación de anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporciona además en la presente memoria un método de tratamiento de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende la administración de un anticuerpo, tal como un anticuerpo totalmente humano, que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. En formas de realización preferidas, los anticuerpos anti-HLIGHT proporcionados en la presente memoria son anticuerpos antagonistas que mejoran, neutralizan o de otro modo inhiben la actividad biológica de hLIGHT *in vivo* (por ejemplo, la producción o secreción de CCL20, IL-8 o RANTES mediada por hLIGHT a partir de células que expresan un ligando de hLIGHT, tal como un receptor de hLIGHT (por ejemplo, HVEM, RLTβ y/o DcR3)). Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Los anticuerpos de la invención también resultan útiles para detectar hLIGHT, así como para mejorar, neutralizar o de otro modo inhibir la actividad de hLIGHT, por ejemplo, en un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que la actividad de hLIGHT resulta perjudicial.

La presente invención proporciona:

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a hLIGHT del mismo, en el que el anticuerpo y el fragmento del mismo se unen a la forma trimérica pero no a la forma monomérica de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo y por el fragmento resulta competitivamente bloqueada por un anticuerpo producido por el hibridoma de ATCC nº de acceso PTA-7819, y en el que la unión no resulta competitivamente bloqueada por los anticuerpos producidos por los hibridomas de ATCC nº de acceso PTA-7729, nº PTA-7842 y nº PTA-7818, en el que el anticuerpo y el fragmento inhiben la unión de HVEM y RLTβ a hLIGHT, y en el que el anticuerpo y el fragmento se unen a las variantes de polimorfismo de nucleótido único (SNP) 214K-32S, 214E-32L y 214K-32L de hLIGHT, en el que el anticuerpo es un anticuerpo antagonista.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión de hLIGHT del mismo según la reivindicación 1, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo y por el fragmento resulta competitivamente bloqueada por un anticuerpo producido por el hibridoma de ATCC nº de acceso PTA-7728.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo compite con HVEM, RLTβ o una proteína de fusión de los mismos para la unión a hLIGHT expresado sobre la superficie celular o hLIGHT soluble.
4. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende: un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos entre el residuo 27 y el residuo 143 de la SEC ID nº 5 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos entre el residuo 23 y el residuo 129 de la SEC ID nº 10.
5. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende VH CDR1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 23, un VH CDR2 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 24 y un VH CDR3 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 25, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende VL CDR1 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 38, un VL CDR2 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 39 y un VL CDR3 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 40.

6. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende un VH y un VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta ATCC nº de acceso PTA-7728.

7. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, y (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma con ATCC nº de acceso PTA-7728.

8. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma con ATCC nº de acceso PTA-7728.

9. El anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo humanizado.

10. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

11. El anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.

12. El fragmento de unión a hLIGHT según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el fragmento es un fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpo, triacuerpo o minicuerpo.

13. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Una molécula de ácidos nucleicos aislada codificante del anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Un vector que comprende la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 14.

16. Una célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 15.

17. Un método de producción del anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo que comprende: cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 16, que presenta el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo expresado y recuperación del anticuerpo o del fragmento de unión a hLIGHT del mismo.

18. Un hibridoma que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

19. El hibridoma según la reivindicación 18 que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 12, en el que el hibridoma presenta el ATCC nº de acceso PTA-7728 (124 F23).

20. Una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un portador farmacéuticamente aceptable.

21. Un kit que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un kit que comprende la composición según la reivindicación 13.

De esta manera, en un aspecto, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo aislado que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble), un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a (a) un epítipo de hLIGHT trimérico (o nativo), (b) un epítipo de hLIGHT monomérico (o desnaturalizado), (c) tanto un epítipo de hLIGHT trimérico como un epítipo de hLIGHT monomérico, (d) un epítipo de hLIGHT trimérico pero no un epítipo de hLIGHT monomérico, o (e) un epítipo de

hLIGHT monomérico pero no un epítipo de hLIGHT trimérico. En formas de realización preferidas, el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT trimérico pero no un epítipo de hLIGHT monomérico humano. En formas de realización preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo E1, un anticuerpo E13, un anticuerpo E63, un anticuerpo F19 o un anticuerpo F23.

Los hibridomas que producen cada uno de los anticuerpos E1, E13, E63, F19 y F23 fueron depositados bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 12 de julio de 2006 (ATCC nº de acceso PTA-7729 (hibridoma 124 E1) y PTA-7728 (hibridoma 124 F23), respectivamente), el 17 de agosto de 2006 (ATCC nº de acceso PTA-7818 (hibridoma 124 E63) y PTA-7819 (hibridoma 124 F19) y el 23 de agosto de 2006 (ATCC nº de acceso PTA-7842 (hibridoma 124 E13). Los anticuerpos producidos por cada uno de los hibridomas 124 E1, 124 E13, 124 E63, 124 F19 y 124 F23 también pueden indicarse en la presente memoria como E1, E13, E63, F19 y F23, respectivamente, y/o por los números de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 y PTA-7728, respectivamente.

Dichos anticuerpos, hibridomas, métodos de preparación de dichos anticuerpos y métodos de utilización de dichos anticuerpos se encuentran todos incluidos en la presente exposición.

En formas de realización específicas, un anticuerpo de la exposición es uno que resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 y/o un anticuerpo E63 para la unión a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o hLIGHT soluble), un fragmento de hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En otras formas de realización, el anticuerpo resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23 para la unión a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble), un fragmento de hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En formas de realización específicas, el anticuerpo resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 y/o un anticuerpo E63, pero no resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23, para la unión a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un hLIGHT soluble), un fragmento de hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En otras formas de realización, el anticuerpo resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23, pero no resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 y/o un anticuerpo E63, para la unión a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un hLIGHT soluble), un fragmento de hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo ejemplificativos en los Ejemplos en la presente memoria.

En la presente memoria se proporcionan además anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente al polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un hLIGHT soluble), un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprenden una cadena VH, una cadena VL, un dominio VH, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y/o VL CDR3 de E1, E13, E63, F19 o F23.

En determinadas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende menos de seis CDR. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende o consiste en una, dos, tres, cuatro o cinco CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y/o VL CDR3. En formas de realización específicas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende o consiste en una, dos, tres, cuatro o cinco CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y/o VL CDR3 de E1, E13, E63, F19 o F23.

En la presente memoria se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-hLIGHT de la exposición, tal como E1, E13, E63, F19 o F23.

En formas de realización específicas, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo antagonista o cualquier combinación de los mismos. En formas de realización particulares, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une inmunoespecíficamente a hLIGHT. En formas de realización preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista.

En determinadas formas de realización, el anticuerpo compite (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) con HVEM, RLT β , DcR3 o proteínas de fusión de los mismos (por ejemplo Fc:HVEM, Fc:RLT β o Fc:DcR3) para la unión a un polipéptido hLIGHT, tal como un polipéptido hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un polipéptido hLIGHT soluble, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo ejemplificativos en los Ejemplos de la presente memoria.

En un segundo aspecto, en la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos aislados codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble), un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En determinadas formas de realización, el ácido nucleico codifica una cadena VH, una cadena VL, un dominio VH, un dominio VL, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y/o VL CDR3 de E1, E13, E63, F19 o F23.

En un tercer aspecto, en la presente memoria se proporcionan vectores y células hospedadoras que comprenden ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT.

En un cuarto aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos de preparación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une inmuno-específicamente a una variante de polimorfismo de nucleótido único (SNP) de un polipéptido hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L y/o 214K-32L. En la presente memoria se proporcionan además hibridomas que producen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT o variante de SNP del mismo. En formas de realización preferidas, el hibridoma es el hibridoma que produce E1, E3, E63, F19 o F23.

En un quinto aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento o, de otro modo, alivio de uno o más síntomas de una enfermedad mediada por hLIGHT en un sujeto (por ejemplo un sujeto humano), que comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un hLIGHT soluble), en el que la actividad de hLIGHT resulta inhibida por el anticuerpo. En determinadas formas de realización, la enfermedad mediada por hLIGHT es una EII, tal como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa. En otras formas de realización, la enfermedad mediada por hLIGHT_h es la EICH.

En un sexto aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir la unión de hLIGHT a EICH, RLTβ y/o DcR3 en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), que comprende la administración en el sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o un hLIGHT soluble).

En un séptimo aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en un sujeto (por ejemplo un sujeto humano), que comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular), en el que la actividad biológica de hLIGHT es reducida o inhibida por el anticuerpo.

En un octavo aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DcR3 en una célula que presenta hLIGHT expresado sobre la superficie celular, poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo hLIGHT expresado sobre la superficie celular o hLIGHT soluble), tal como un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT.

En un noveno aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que presenta un receptor de hLIGHT expresado sobre la superficie celular (tal como HVEM, RLTβ y/o DcR3), poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble, o una variante de SNP del mismo), en el que la actividad biológica de hLIGHT es reducida o inhibida por el anticuerpo.

En un décimo aspecto, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende además un marcador detectable. En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-hLIGHT que comprenden un marcador detectable se utilizan en un método para la detección de hLIGHT en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-hLIGHT. En formas de realización específicas, la muestra comprende una célula que expresa hLIGHT sobre la superficie de la célula.

En un undécimo aspecto, en la presente memoria se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT.

Terminología

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado al entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para un término en la presente memoria, las proporcionadas en la presente sección prevalecerán, a menos que se indique lo contrario.

El término “aproximadamente” se refiere a dentro de 20%, preferentemente dentro de 10%, y más preferentemente dentro de 5% (o 1% o inferior) de un valor o intervalo dado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “administrar” o “administración” se refiere al acto de inyectar o de otro modo transportar físicamente una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-hLIGHT proporcionado en la presente memoria) hasta el interior del paciente, tal como mediante vía mucosal, intradérmica, intravenosa o intramuscular, y/o cualquier otro método de administración física indicado en la presente memoria o conocido de la técnica. Al tratar una enfermedad, o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia típicamente se produce tras el inicio de la enfermedad o de los síntomas de la misma. En el caso de la prevención de una enfermedad, o de síntomas de la misma, la administración de la sustancia típicamente se produce antes de la aparición de la enfermedad o síntomas de la misma.

En el contexto de un polipéptido, el término “análogo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que presenta una función similar o idéntica a la de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT pero no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT o presenta una estructura similar o idéntica a la de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT. Un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un polipéptido que satisface por lo menos uno de los siguientes: (a) un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% y preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente por lo menos 95%, o todavía más preferentemente por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido hLIGHT (por ejemplo SEC ID nº 52), un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT indicado en la presente memoria, (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones restrictivas con una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT (o región VH o VL del mismo) indicado en la presente memoria de por lo menos 5 residuos aminoácidos, de por lo menos 10 residuos aminoácidos, de por lo menos 15 residuos aminoácidos, de por lo menos 20 residuos aminoácidos, de por lo menos 25 residuos aminoácidos, de por lo menos 40 residuos aminoácidos, de por lo menos 50 residuos aminoácidos, de por lo menos 60 residuos aminoácidos, de por lo menos 70 residuos aminoácidos, de por lo menos 80 residuos aminoácidos, de por lo menos 90 residuos aminoácidos, de por lo menos 100 residuos aminoácidos, de por lo menos 125 residuos aminoácidos o de por lo menos 150 residuos aminoácidos (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982), y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85% y preferentemente por lo menos 90%, más preferentemente por lo menos 95%, o todavía más preferentemente por lo menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo anti-hLIGHT indicado en la presente memoria se refiere a un polipéptido que presenta una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar a la de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de hLIGHT o un anticuerpo de hLIGHT indicado en la presente memoria. La estructura de un polipéptido puede determinarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la microscopía de electrones cristalográfica.

Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de las dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). A continuación, se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones aminoácidas o las posiciones nucleótidas correspondientes. En el caso de que una posición en la primera secuencia se encuentre ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido en la posición correspondiente en la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad de las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por la secuencia (es decir, % de identidad=(número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones) X 100%) En una forma de realización, las dos secuencias presentan la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias (por ejemplo, secuencias de aminoácidos o

secuencias de ácidos nucleicos) también puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferente de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, modificado por Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993. Dicho algoritmo ha sido incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403, 1990. Pueden llevarse a cabo búsquedas de nucleótidos de BLAST con los parámetros de nucleótidos del programa NBLAST fijados en, por ejemplo, para puntuación=100, longitud de palabra=12, con el fin de obtener secuencias homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención. Pueden llevarse a cabo búsquedas de proteínas de BLAST con los parámetros de programa XBLAST fijados en, por ejemplo, puntuación 50, longitud de palabra=3, con el fin de obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Con el fin de obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST (BLAST con huecos) tal como se indica en Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. Alternativamente, puede utilizarse PSI BLAST para llevar a cabo una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Al utilizar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI Blast, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo de XBLAST y NBLAST) (ver, por ejemplo el National Center for Biotechnology Information (NCBI) en www.ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo no limitativo preferente de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 4:11-17, 1988. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Al utilizar el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede utilizarse una tabla de ponderación de residuos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las indicadas anteriormente, permitiendo o no huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, típicamente sólo se cuentan las correspondencias exactas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "antagonista" o "inhibidor" de hLIGHT se refiere a una molécula que es capaz de inhibir o, de otro modo, reducir una o más de las actividades biológicas de hLIGHT, tal como en una célula que expresa hLIGHT o en una célula que expresa un ligando de hLIGHT, tal como en una célula que expresa hLIGHT o en una célula que expresa un ligando de hLIGHT, tal como un receptor de hLIGHT. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos antagonistas que inhiben o, de otro modo, reducen la secreción de CCL20, IL-8 y/o RANTES a partir de una célula que presenta un receptor de hLIGHT expresado sobre la superficie celular (por ejemplo, HVEM, RLTβ y/o DcR3) al poner en contacto dicho anticuerpo con dicha célula. En algunas formas de realización, un antagonista de hLIGHT (por ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención) puede actuar, por ejemplo, mediante la inhibición o, de otro modo, la reducción de la activación y/o rutas de señalización celular de la célula que expresa un receptor de hLIGHT, inhibiendo de esta manera una actividad biológica mediada por hLIGHT de la célula en comparación con la actividad biológica mediada por hLIGHT en ausencia del antagonista. En determinadas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos anti-hLIGHT antagonistas totalmente humanos, preferentemente anticuerpos anti-hLIGHT antagonistas monoclonales totalmente humanos.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina", o "Ig", pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente memoria. Las expresiones "anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de hLIGHT", "anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT", "anticuerpos anti-hLIGHT" y expresiones análogas también se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria y se refieren a anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido hLIGHT, tal como un antígeno o epítipo de hLIGHT. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno de hLIGHT puede presentar reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno de hLIGHT no reacciona cruzadamente con otros antígenos. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno de hLIGHT puede identificarse mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por el experto en la materia. Un anticuerpo o un fragmento del mismo se une específicamente a un antígeno hLIGHT en el caso de que se una a un antígeno de hLIGHT con afinidad más elevada que a cualquier antígeno de reactividad cruzada según se determine utilizando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Típicamente, una reacción específica o selectiva presentará por lo menos el doble de la señal de fondo o ruido y más típicamente diez veces la señal de fondo. Ver, por ejemplo, Paul, editor, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York, páginas 332 a 336, 1989, para un comentario sobre la especificidad de los anticuerpos.

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos, intracuerpos, Fv de cadena sencilla (scFv) (por ejemplo incluyendo mono-específicos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos mediante disulfuro (sdFv), anticuerpos antidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriormente indicados. En particular, entre los anticuerpos

de la presente invención se incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios o moléculas de unión a antígeno que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno de hLIGHT (por ejemplo, una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-hLIGHT). Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o cualquier subclase (por ejemplo IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. En formas de realización preferidas, los anticuerpos hLIGHT son totalmente humanos, tales como anticuerpos de hLIGHT monoclonales totalmente humanos. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos IgG, o una clase (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana) o subclase de los mismos.

Las expresiones “dominio de unión a antígeno”, “región de unión a antígeno”, “fragmento de unión a antígeno” y expresiones similares se refieren a la parte de un anticuerpo que comprende los residuos aminoácidos que interactúan con el antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad para el antígeno (por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad (CDR)). La región de unión a antígeno puede derivarse de cualquier especie animal, tal como roedores (por ejemplo, conejos, ratas o hámsters) y seres humanos. Preferentemente, la región de unión a antígeno es de origen humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “composición” pretende comprender un producto que contiene los ingredientes especificados (por ejemplo, un anticuerpo de la invención) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en, opcionalmente, las cantidades especificadas.

La expresión “región constante” o “dominio constante” se refiere a una parte carboxi-terminal de las cadenas ligeras y pesadas que no participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero que muestra diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. Las expresiones se refieren a la parte de una molécula de inmunoglobulina que presenta una secuencia de aminoácidos más conservada respecto a la otra parte de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CHL de la cadena ligera.

En el contexto de un polipéptido, el término “derivado” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT que ha sido alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos aminoácidos. El término “derivado” tal como se utiliza en la presente memoria también se refiere a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de un polipéptido hLIGHT o a un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT que ha sido modificado químicamente, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, aunque no a título limitativo, un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo hLIGHT puede ser químicamente modificado, por ejemplo mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación con grupos protectores/bloqueantes conocidos, corte proteolítico, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Los derivados se modifican de una manera que es diferente de los péptidos o polipéptidos naturales o de partida, sea en el tipo o en la localización de las moléculas unidas. Entre los derivados se incluyen además la deleción de uno o más grupos químicos que se encuentran naturalmente presentes en el péptido o polipéptido. Un derivado de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo hLIGHT puede modificarse químicamente mediante modificaciones químicas utilizando técnicas conocidas por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, el corte químico específico, la acetilación, la formulación, la síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o un anticuerpo de hLIGHT puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Un derivado de polipéptido presenta una función similar o idéntica a la de un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un anticuerpo de hLIGHT tal como se indica en la presente memoria.

La expresión “cantidad eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo un anticuerpo o composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria) que resulta suficiente para reducir y/o mejorar la severidad y/o la duración de una enfermedad dada y/o síntoma relacionado con la misma. Dicha expresión comprende además la cantidad necesaria para la reducción o mejora del avance o progresión de una enfermedad dada, la reducción o mejora de la recurrencia, el desarrollo o aparición de una enfermedad dada y/o la mejora o potenciación del efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo una terapia diferente del anticuerpo anti-hLIGHT proporcionado en la presente memoria). En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg (mg de anticuerpo por kg de peso del sujeto) y aproximadamente 100 mg/kg. En determinadas formas de realización, una cantidad eficaz de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente

45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg (o un intervalo de los mismos). En algunas formas de realización, “cantidad eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere además a la cantidad de un anticuerpo de la invención para conseguir un resultado especificado (por ejemplo la inhibición de una actividad biológica de hLIGHT de la célula, tal como la inhibición de la secreción de CCL20, IL-8 o RANTES de la célula).

El término “epítipo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una región localizada sobre la superficie de un antígeno, tal como un polipéptido hLIGHT o fragmento de polipéptido hLIGHT, que es capaz de unirse a una o más regiones de unión a antígeno de un anticuerpo y que presenta actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente en un ser humano, que es capaz de inducir una respuesta inmunológica. Un epítipo con actividad inmunogénica es una parte de un polipéptido que induce una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo con actividad antigénica es una parte de un polipéptido al que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente según se determine mediante cualquier método bien conocido de la técnica, por ejemplo mediante los inmunoensayos indicados en la presente memoria. Los epítipos antigénicos no son necesariamente inmunogénicos. Habitualmente los epítipos consisten en agrupaciones de moléculas en superficie químicamente activas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y presentan características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede reunirse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no un elemento de superficie tridimensional del antígeno. En determinadas formas de realización, un epítipo de hLIGHT es un elemento superficial tridimensional de un polipéptido hLIGHT (por ejemplo en una forma trimérica de un polipéptido hLIGHT). En otras formas de realización, un epítipo de hLIGHT es un elemento lineal de un polipéptido hLIGHT (por ejemplo en una forma trimérica o forma monomérica del polipéptido hLIGHT). Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria pueden unirse inmunoespecíficamente a un epítipo de la forma monomérica (desnaturalizada) de hLIGHT, un epítipo de la forma trimérica (nativa) de hLIGHT, o tanto la forma monomérica (desnaturalizada) como la forma trimérica (nativa) de hLIGHT. En formas de realización específicas, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se unen inmunoespecíficamente a un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT pero no se unen inmunoespecíficamente a la forma monomérica de hLIGHT.

El término “excipientes” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sustancias inertes que son utilizadas comúnmente como diluyente, vehículo, conservantes, ligantes o agente estabilizante para fármacos, e incluye, aunque sin limitación, proteínas (por ejemplo albúmina sérica, etc.), aminoácidos (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), surfactantes (por ejemplo SDS, polisorbato, surfactante no iónico, etc.), sacáridos (por ejemplo sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.) y polioles (por ejemplo manitol, sorbitol, etc.). Ver también Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

En el contexto de un péptido o polipéptido, el término “fragmento” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede surgir, por ejemplo, del truncado en el extremo amino-terminal, del truncado en el extremo carboxi-terminal y/o de una delección interna de uno o más residuos de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden resultar, por ejemplo, de un procesamiento alternativo del ARN o de actividad de proteasa *in vivo*. En determinadas formas de realización, entre los fragmentos de hLIGHT se incluyen los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de por lo menos 5 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 10 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 15 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 20 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 25 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 40 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 50 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 60 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 70 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 80 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 90 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 100 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 125 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 150 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 175 residuos aminoácidos contiguos, de por lo menos 200 residuos aminoácidos contiguos, o de por lo menos 250 residuos aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido hLIGHT o de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido hLIGHT. En una forma de realización específica, un fragmento de un polipéptido hLIGHT o de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de hLIGHT conserva por lo menos 1, por lo menos 2 o por lo menos 3 funciones del polipéptido o anticuerpo.

Las expresiones “anticuerpo totalmente humano” y “anticuerpo humano” se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, más preferentemente, una región constante humana. En formas de realización específicas, las expresiones se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. Los anticuerpos anti-hLIGHT “totalmente humanos”, en determinadas formas de realización, pueden comprender además anticuerpos que se unen a polipéptidos hLIGHT y están codificados por secuencias de ácidos nucleicos que son variantes somáticas naturales e una secuencia de ácidos nucleicos de inmunoglobulina de la línea

germinal humana. En una forma de realización específica, los anticuerpos anti-HLIGHT proporcionados en la presente memoria son anticuerpos totalmente humanos. La expresión “anticuerpo totalmente humano” incluye anticuerpos que presentan regiones variables y constantes correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana tal como se indica en Kabat *et al.* (ver Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242, 1991). Se proporcionan métodos ejemplificativos e producción de anticuerpos totalmente humanos, por ejemplo en los Ejemplos en la presente memoria, aunque puede utilizarse cualquier método conocido de la técnica.

La expresión “anticuerpo humano recombinante” incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transferido al interior de una célula hospedadora, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorial recombinante, anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo un ratón o una vaca) que es transgénico y/o transcromosómico para los genes d inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor L.D. *et al.*, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295, 1992) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que implican el procesamiento de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden presentar regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (ver Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242, 1991). En determinadas formas de realización, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o en el caso de que se utilice un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, de esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión “proteína de fusión” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína heterólogo (es decir, un polipéptido o proteína que normalmente no es una parte del anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo no anti-antígeno hLIGHT)). El término “fusión” utilizado en relación a hLIGHT o a un anticuerpo anti-HLIGHT se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivado del mismo, a un péptido o polipéptido heterólogo. Preferentemente, la proteína de fusión conserva la actividad biológica de hLIGHT o del anticuerpo anti-HLIGHT. En determinadas formas de realización, la proteína de fusión comprende un dominio VH, dominio VL, VH CDR (una, dos o tres CDR de VH) y/o VL CDR (una, dos o tres CDR de VL) de anticuerpo de hLIGHT, en el que la proteína de fusión se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT.

La expresión “cadena pesada” utilizada en referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos diferentes, denominados alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basados en las secuencias de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. Estos tipos diferentes de cadena pesada son bien conocidos y dan lugar a cinco clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo cuatro subclases de IgG, es decir IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4. Preferentemente, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

El término “huésped” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano.

La expresión “célula hospedadora” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la célula sujeto particular transfectada con una molécula de ácidos nucleicos y la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácidos nucleicos debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o la integración de la molécula de ácidos nucleicos en el genoma de la célula hospedadora.

La expresión “agente inmunomodulador” y variaciones de la misma, incluyendo, aunque sin limitación, agentes inmunomoduladores, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En determinadas formas de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En determinadas otras formas de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Según la invención, un agente inmunomodulador utilizado en las terapias de combinación de la invención no incluye un anticuerpo anti-HLIGHT o fragmento de unión a antígeno. Entre los agentes inmunomoduladores se incluyen, aunque sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “en combinación” en el contexto de la administración de otras terapias se refiere a la utilización de más de una terapia. La utilización de la expresión “en combinación” no restringe el orden en que se administran las terapias en un sujeto con una infección. Puede administrarse una primera terapia antes (por ejemplo 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5

semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas), concurrentemente, o después (por ejemplo 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas) de la administración de una segunda terapia en el sujeto que ha presentado, presenta o es susceptible de presentar una enfermedad mediada por hLIGHT. Puede administrarse cualquier terapia adicional en cualquier orden con las otras terapias adicionales. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con una o más terapias (por ejemplo terapias que no son los anticuerpos de la invención que se administran actualmente para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT. Entre los ejemplos no limitativos de terapias que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo de la invención se incluyen agentes analgésicos, agentes anestésicos, antibióticos o agentes inmunomoduladores o cualquier otro agente listado en la Farmacopea US y/o en la obra "Physician's Desk Reference".

La expresión "sal inorgánica" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualesquiera compuestos que no contienen carbono que resulten de la sustitución de parte o la totalidad de hidrógenos del ácido o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal y con frecuencia se utilizan como compuesto ajustador de la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH_2PO_4 , etc.

Un anticuerpo "aislado" o "purificado" se encuentra sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos a partir de la que se deriva el anticuerpo, o se encuentra sustancialmente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos al sintetizarlo químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo está separado de componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o se produce recombinantemente. De esta manera, un anticuerpo que se encuentra sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo con menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en la presente memoria "proteína contaminante"). En el caso de que el anticuerpo se produzca recombinantemente, preferentemente también se encuentra sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10% o 5% del volumen de la preparación de proteína. En el caso de que el anticuerpo se produzca mediante síntesis química, preferentemente se encuentra sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, se encuentra separado de precursores químicos u otros compuestos químicos que participan en la síntesis de la proteína. De acuerdo con lo anterior, dichas preparaciones del anticuerpo presentan menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos diferentes del anticuerpo de interés. En una forma de realización preferente, se aíslan o se purifican los anticuerpos de la invención.

Una molécula de ácidos nucleicos "aislada" es una que se ha separado de otras moléculas de ácidos nucleicos que se encuentran presentes en la fuente natural de la molécula de ácidos nucleicos. Además, una molécula de ácidos nucleicos "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede encontrarse sustancialmente libre de otro material celular, o de medio de cultivo en el caso de que se produzca mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos en el caso de que se sintetice químicamente. En una forma de realización específica, se aísla o se purifica una o más moléculas de ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo de la invención.

La expresión "LIGHT humana", "hLIGHT" o "polipéptido hLIGHT" y términos similares se refieren a los polipéptidos ("polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria) que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 52 y polipéptidos relacionados, incluyendo variantes SNP de los mismos. Entre los polipéptidos relacionados se incluyen variantes alélicas (por ejemplo variantes SNP), variantes de procesamiento, fragmentos, derivados, variantes por sustitución, delección e inserción, polipéptidos de fusión y homólogos inter-especie, preferentemente que conservan actividad de hLIGHT y/o resultan suficientes para generar una respuesta inmunológica anti-hLIGHT. Entre las variantes SNP no sinónimas ejemplificativas se incluyen, aunque sin limitación, polipéptidos hLIGHT que comprenden 214E-32S (un ácido glutámico en la posición 214 y serina en la posición 32 de un polipéptido hLIGHT (por ejemplo el polipéptido hLIGHT ilustrado en SEC ID nº 52)), 214K-32S, 214E-32L y 214E-32L. También se encuentran comprendidas las formas solubles de hLIGHT que resultan suficientes para generar una respuesta inmunológica anti-hLIGHT ver, por ejemplo, SEC ID nº 53 y SEC ID nº 54). Tal como apreciará el experto en la materia, un anticuerpo anti-hLIGHT de la invención puede unirse a un polipéptido hLIGHT, fragmento de polipéptido, antígeno y/o epítipo, ya que un epítipo es parte del antígeno de mayor tamaño, que es parte del fragmento de polipéptido de mayor tamaño, que, a su vez, es parte del polipéptido de mayor tamaño. hLIGHT puede existir en una forma trimérica (nativa) o monomérica (desnaturalizada).

La expresión "numeración de Kabat" y expresiones similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de los residuos aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, o de una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391, 1971, y Kabat *et al.*,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH nº 91-3242, 1991). Para las regiones variables de cadena pesada, la región hipervariable típicamente se encuentra comprendida entre las posiciones aminoácidas 31 y 35 para CDR1, entre las posiciones aminoácidas 50 y 65 para CDR2 y entre las posiciones aminoácidas 95 y 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable típicamente se encuentra comprendida entre las posiciones aminoácidas 24 y 34 para CDR1, entre las posiciones aminoácidas 50 y 56 para CDR2 y entre las posiciones aminoácidas 89 y 97 para CDR3.

La expresión “cadena ligera”, utilizada en referencia a un anticuerpo se refiere a dos tipos diferentes, denominados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son bien conocidas de la técnica. En formas de realización preferidas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “controlar”, “controlando” y “control” se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene a partir de una terapia (por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico), que no resulta en una cura de la infección. En determinadas formas de realización, en el sujeto se administran una o más terapias (por ejemplo agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo de la invención) para “controlar” una enfermedad mediada por hLIGHT (por ejemplo EII o EICH), uno o más síntomas de la misma, de manera que se evita la progresión o agravamiento de la enfermedad.

La expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos, y cada anticuerpo monoclonal típicamente reconoce un único epítipo sobre el antígeno. En formas de realización preferidas, un “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente memoria es un anticuerpo producido por un único hibridoma u otra célula, en el que el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a sólo un epítipo de hLIGHT según se determine mediante, por ejemplo, ELISA u otro ensayo de unión a antígeno o unión competitiva conocido de la técnica o en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria. El término “monoclonal” no se encuentra limitado a ningún método particular de preparación del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma tal como se indica en Kohler *et al.*, Nature 256:495, 1975, o pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas utilizando técnicas tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de esta manera son bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, el capítulo 11 en: “Short Protocols in Molecular Biology”, 5a edición, Ausubel *et al.*, editores, John Wiley and Sons, New York, 2002). Otros métodos ejemplificativos de producción de otros anticuerpos monoclonales se proporcionan en los Ejemplos en la presente memoria.

La expresión “natural” o “nativo” utilizado en relación a materiales biológicos tales como moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refiere a aquellos presentes en la naturaleza y no manipulados por el ser humano.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a autorizado por la agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o que se encuentra listada en la Farmacopea US, Farmacopea europea u otra Farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos.

La expresión “anticuerpos policlonales” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una población de anticuerpos generada en una respuesta inmunogénica a una proteína que presenta muchos epítopos y que, de esta manera, incluye una diversidad de diferentes anticuerpos dirigidos contra el mismo epítipo y contra diferentes epítopos dentro de la proteína. Los métodos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, el capítulo 11 en: “Short Protocols in Molecular Biology”, 5a edición, Ausubel *et al.*, editores, John Wiley and Sons, New York, 2002).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido”, “nucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácidos nucleicos” y otros términos similares se utilizan intercambiabilmente e incluyen ADN, ARN, ARNm y similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “prevenir”, “previniendo” y “prevención” se refieren a la inhibición total o parcial del desarrollo, recurrencia, aparición o extensión de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntomas relacionados con la misma, resultando de la administración de una terapia o combinación de terapias proporcionada en la presente memoria (por ejemplo una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo de la invención).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente profiláctico” se refiere a cualquier agente que puede inhibir total o parcialmente el desarrollo, recurrencia, aparición o extensión de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntomas relacionados con la misma en un sujeto. En determinadas formas de realización, la expresión “agente profiláctico” se refiere a un agente diferente de un anticuerpo de la invención.

Preferentemente, un agente profiláctico es un agente que es conocido que resulta útil o que ha sido utilizado o se utiliza actualmente para prevenir una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma relacionado con la misma, o para impedir la aparición, desarrollo, progresión y/o severidad de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma relacionado con la misma. En formas de realización específicas, el agente profiláctico es un anticuerpo anti-hLIGHT totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT totalmente humano.

En determinadas formas de realización de la invención, un “título sérico profilácticamente eficaz” es un título sérico en un sujeto, preferentemente un ser humano, que inhibe total parcialmente el desarrollo, recurrencia, aparición o extensión de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntoma relacionado con la misma en dicho sujeto.

La expresión “antígeno hLIGHT” se refiere a la parte de un polipéptido hLIGHT a la que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo. Un antígeno hLIGHT también se refiere a un análogo o derivado de un polipéptido hLIGHT o fragmento del mismo al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo. En algunas formas de realización, un antígeno hLIGHT es un antígeno hLIGHT monomérico o un antígeno hLIGHT trimérico. Una región de un polipéptido hLIGHT que contribuye un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede reunirse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no un elemento de superficie tridimensional del antígeno. Una región localizada sobre la superficie de un antígeno hLIGHT que es capaz de inducir una respuesta inmunológica es un epítipo de hLIGHT. El epítipo puede ser o no un elemento de superficie tridimensional del antígeno.

Una “enfermedad mediada por hLIGHT” y “trastorno mediado por hLIGHT” se utilizan intercambiamente y se refieren a cualquier enfermedad que es causada completa o parcialmente, o es el resultado de, hLIGHT. En determinadas formas de realización, hLIGHT se expresa aberrantemente (por ejemplo a nivel elevado) sobre la superficie de una célula. En algunas formas de realización, hLIGHT puede encontrarse regulado positivamente aberrantemente en un tipo celular particular. En otras formas de realización, la señalización celular normal, aberrante o excesiva está causada por la unión de hLIGHT a un ligando de hLIGHT. En determinadas formas de realización el ligando de hLIGHT es un receptor de hLIGHT (por ejemplo HVEM, RLTβ o DCR3), por ejemplo, que se expresa sobre la superficie de una célula, tal como una célula epitelial colónica. En determinadas formas de realización, la enfermedad mediada por hLIGHT es una enfermedad intestinal inflamatoria (EII), tal como la enfermedad de Crohn (EC) o la colitis ulcerosa (CU). En otras formas de realización, la enfermedad mediada por hLIGHT es la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH).

Un “ligando de hLIGHT” se refiere a una molécula que se une o que, de otro modo, interactúa con hLIGHT. En formas de realización preferidas el ligando de hLIGHT es un receptor de hLIGHT.

Las expresiones “receptor de hLIGHT” o “receptor de unión a hLIGHT” se utilizan intercambiamente en la presente memoria y se refieren a un polipéptido receptor que se une a hLIGHT. En formas de realización específicas, el receptor de hLIGHT es HVEM, FcβR o DcR3. En algunas formas de realización, el receptor de hLIGHT se expresa sobre la superficie de una célula, tal como una célula epitelial colónica.

El término “sacárido” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una clase de moléculas que son derivados de alcoholes polihídricos. Los sacáridos se denominan comúnmente carbohidratos y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacáridos), por ejemplo monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

La expresión “título sérico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un título sérico promedio en una población de por lo menos 10, preferentemente por lo menos 20, y más preferentemente por lo menos 40 sujetos, y hasta aproximadamente 100, 1.000 o más.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “efectos secundarios” comprende efectos no deseados y adversos de una terapia (por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico). Los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso de una terapia (por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico) podría resultar dañino o incómodo o peligroso. Entre los ejemplos de efectos secundarios se incluyen diarrea, tos, gastroenteritis, sibilancias, náuseas, vómitos, anorexia, cólicos abdominales, fiebre, dolor, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio, mareo, mucositis, efectos nerviosos y musculares, fatiga, boca seca y pérdida del apetito, erupciones o hinchazón en el sitio de la administración, síntomas de tipo gripal, tales como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos no deseados adicionales experimentados por los pacientes son numerosos y conocidos de la técnica. Muchos se describen en la obra “Physician’s Desk Reference” (60ª edición, 2006).

La expresión “molécula pequeña” y expresiones análogas incluyen, aunque sin limitación, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y/o ganometálicos) con un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos con un peso molecular

inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos e inorgánicos con un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

5 Los términos “estabilidad” y “estable” tal como se utilizan en la presente memoria en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT se refieren a la resistencia del anticuerpo en la formulación al despliegue, agregación, degradación o fragmentación
10 térmicas y químicas bajo condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. Las formulaciones “estables” de la invención conservan una actividad biológica igual o superior a 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% bajo condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. La estabilidad del anticuerpo puede evaluarse mediante grados de agregación, degradación o fragmentación mediante métodos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitación, la electroforesis en gel capilar reducida (EGCr), la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con un anticuerpo de referencia. La estabilidad global de una formulación que
15 comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT puede evaluarse mediante diversos ensayos inmunológicos, incluyendo, por ejemplo, ELISA y radioinmunoensayo utilizando el epítipo específico de hLIGHT.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan intercambiamente. Tal como se utiliza en la presente memoria, un sujeto es preferentemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, gatos, ratas, etc.) o un primate por ejemplo monos y seres humanos), más preferentemente un ser humano. En una forma de realización, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, que presenta una enfermedad mediada por hLIGHT. En otra forma de realización, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, en riesgo de desarrollar una enfermedad
20 mediada por hLIGHT.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “sustancialmente la totalidad” se refiere a por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% o por lo menos aproximadamente 100%.

La expresión “sustancialmente libre de surfactante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una formulación de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, conteniendo dicha formulación menos de 0,0005%, menos de 0,0003% o menos de 0,0001% de surfactantes y/o menos de 0,0005%, menos de 0,0003% o menos de 0,0001% de surfactantes.

La expresión “sustancialmente libre de sales” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una formulación de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, conteniendo dicha formulación menos de 0,0005%, menos de 0,0003% o menos de 0,0001% de sales inorgánicas.

El término “surfactante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sustancias orgánicas que presentan estructuras anfipáticas; es decir, están compuestos de grupos de tendencias de solubilidad contrarias, típicamente una cadena hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los surfactantes
45 pueden clasificarse, dependiendo de la carga de la fracción activa en superficie, en surfactantes aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los surfactantes se utilizan con frecuencia como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizadores y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “marcador” se refiere a cualquier tipo de fracción que está unida a, por ejemplo, un polipéptido y/o un polinucleótido que codifica un hLIGHT o anticuerpo de hLIGHT o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica hLIGHT, anticuerpo de hLIGHT o fragmento de unión a antígeno del mismo puede contener una o más secuencias de nucleótidos codificantes de marcador adicionales que codifican una, por ejemplo, fracción detectable o una fracción que ayuda a la purificación por afinidad. Al traducirla, el marcador y el anticuerpo puede encontrarse en forma de una proteína de fusión. El término “detectable” o “detección” en referencia a un marcador se refiere a cualquier marcador que sea capaz de ser visualizado o en la que la presencia del marcador puede, de otro modo, ser determinada y/o medida (por ejemplo mediante cuantificación). Un ejemplo no limitativo de un marcador detectable es un marcador fluorescente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente terapéutico” se refiere a cualquier agente que pueda utilizarse en el tratamiento, control o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma relacionada con la misma. En determinadas formas de realización, la expresión “agente terapéutico” se refiere a un anticuerpo de la invención. En otras formas de realización determinadas, la expresión “agente terapéutico” se refiere a un agente diferente de un anticuerpo de la invención. Preferentemente, un agente terapéutico es un agente que es conocido que resulta útil o que ha sido utilizado o se utiliza actualmente para el tratamiento, el

control o la mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT o uno o más síntomas relacionados con la misma. Finalmente, el efecto sinérgico e una combinación de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados que se asocian a la utilización de cualquier monoterapia.

En determinadas formas de realización de la invención, un “título sérico terapéuticamente eficaz” es el título sérico en un sujeto, preferentemente un ser humano, que reduce la severidad, la duración y/o los síntomas asociados a una enfermedad mediada por hLIGHT en dicho sujeto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “terapia” se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que puede utilizarse en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad relacionada con hLIGHT (por ejemplo EII o EICH). En determinadas formas de realización, los términos “terapias” y “terapia” se refieren a una terapia biológica, terapia de soporte y/o otras terapias útiles en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT conocida por el experto en la materia, tal como personal médico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “tratar”, “tratamiento” y “tratando” se refieren a la reducción o mejora de la progresión, severidad y/o duración de una enfermedad mediada por hLIGHT (por ejemplo, EII o EICH) resultante de la administración de una o más terapias (incluyendo, aunque sin limitación, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo de la invención). En formas de realización específicas, dichos términos se refieren a la reducción o inhibición de la unión de hLIGHT a HVEM, la reducción o inhibición de la unión de hLIGHT a RLT β , la reducción o inhibición de la unión de hLIGHT a DcR3, la reducción o inhibición de la producción o secreción de CCL20 a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, la reducción o inhibición de la producción o secreción de IL-8 a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, la reducción o inhibición de la producción o secreción de RANTES a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, y/o la inhibición o reducción de uno o más de los síntomas asociados a una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como una EII o una EICH. En formas de realización específicas, el agente profiláctico es un anticuerpo anti-hLIGHT totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT totalmente humano.

La expresión “región variable” o “dominio variable” se refiere a una parte de las cadenas ligeras y pesadas, típicamente aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y entre aproximadamente 100 y 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad de la secuencia se concentra en aquellas regiones denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se denominan regiones marco (FR). Las CDR de las cadenas pesadas y ligeras son las principalmente responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno. La numeración de las posiciones aminoácidos utilizada en la presente memoria es el índice EU, tal como en Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.), 5a ed. (“Kabat *et al.*”), 1991. En formas de realización preferidas, la región variable es una región variable humana.

El término “variante” utilizada en relación a hLIGHT o a un anticuerpo de hLIGHT se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más (tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, y preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15, más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5) sustituciones, deleciones y/o adiciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia nativa o no modificada. Por ejemplo, una variante de hLIGHT puede resultar de una o más (tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, y preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15, más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5) cambios a la secuencia de aminoácidos de hLIGHT nativa. También a título de ejemplo, una variante de un anticuerpo anti-hLIGHT puede resultar de una o más (tal como, por ejemplo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, y preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15, más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5) cambios a una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-hLIGHT nativa o previamente no modificado. Las variantes pueden ser naturales, tales como variantes alélicas o de procesamiento, o pueden construirse artificialmente. Pueden prepararse variantes de polipéptido a partir de las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes codificantes de dichas variantes. En formas de realización preferidas, la variante de hLIGHT o variante de anticuerpo de hLIGHT conserva la actividad funcional de hLIGHT o del anticuerpo de hLIGHT, respectivamente. En formas de realización específicas, una variante del anticuerpo de hLIGHT se une inmunoespecíficamente a hLIGHT y/o es antagonista de la actividad de hLIGHT. En determinadas formas de realización, la variante se encuentra codificada por una variante de polimorfismo de nucleótido único (SNP) de hLIGHT. Una variante SNP ejemplificativa de hLIGHT codifica un ácido glutámico (E) o una lisina (K) en la posición aminoácida 214. Otra variante SNP ejemplificativa de hLIGHT codifica una serina

(S) o una leucina (L) en la posición aminoácida 32.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1A-1B ilustra un análisis citométrico de hLIGHT expresado endógenamente con anticuerpos anti-HLIGHT humanos. (A) La línea de células T humanas II23.D7 se activó con PMA e yonomicina durante la noche y se tiñó para el marcador de activación CD69 en combinación con diversos anticuerpos anti-HLIGHT. Las células positivas para CD69 se separaron y se analizaron para la tinción de hLIGHT (línea en negrita) en comparación con IgG1 anti-influenza humana de control (línea de puntos) o la tinción de células II23.D7 no
- 10 activadas con anticuerpos anti-HLIGHT (línea gris). Se detectó la unión con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana-APC. (B) La tinción de la línea de células T humanas II-23.D7 activada con anticuerpos anti-HLIGHT humanos es saturable. Las células II-23.D7 activadas se marcaron con anticuerpos anti-HLIGHT humanos a diversas concentraciones y se detectaron con anti-IgG humano-APC. Los gráficos de los datos de media geométrica de intensidad de fluorescencia se muestran junto con la regresión no lineal.
- 15 La figura 2A-2B ilustra la tinción de hLIGHT recombinante en la línea celular EL4-HLIGHT con anticuerpos anti-HLIGHT humanos. En (A) y (B), se utilizaron cantidades gradadas de anticuerpos anti-HLIGHT para teñir células EL4-HLIGHT, se detectaron con anti-IgG humana-APC y se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó la media geométrica de intensidad de fluorescencia (IMF) y se aplicó el análisis de regresión no lineal. En todos los experimentos se utilizó anticuerpo humano anti-proteína M2 de influenza a modo de control negativo. Los datos obtenidos del presente análisis se representan en la figura 3.
- 20 La figura 3 ilustra las características de los anticuerpos monoclonales humanos anti-HLIGHT.
- 25 La figura 4 ilustra el bloqueo cruzado de anticuerpos mediante ELISA. Este análisis define dos grupos basándose en la competición para la unión a hLIGHT mediante ELISA. Los anticuerpos individuales se utilizaron para recubrir los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se preincubó FLAG-HLIGHT soluble con anticuerpos anti-HLIGHT solubles y después se añadieron a los pocillos recubiertos. La unión de FLAG-HLIGHT al anticuerpo recubierto se detectó con IgG-HRP anti-FLAG. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la DO de cada muestra en la fórmula siguiente: % de inhibición=(max. – muestra/max.) x 100.
- 30 La figura 5A-5B ilustra el bloqueo de la unión de HVEM humano:Fc a hLIGHT nativa sobre la superficie celular por anticuerpos monoclonales anti-HLIGHT humanos. En (A) y (B), se incubaron cantidades gradadas de anticuerpo con células EL4-HLIGHT, se añadió HVEM humano biotinilado:Fc a una concentración sub-saturante y se detectó con SA-APC. Tal como se muestra en (A), se utilizó el anticuerpo anti-M2 de influenza humano a modo de control.
- 35 La figura 6A-6B ilustra el bloqueo de la unión de RLTβ:Fc humano a hLIGHT nativo sobre la superficie celular por anticuerpos monoclonales humanos anti-HLIGHT. En (A)-(B), se incubaron cantidades gradadas de anticuerpos con células EL4-HLIGHT, se añadieron RLTβ:Fc humano marcado con poli-His a una concentración sub-saturante y se detectaron con anti-His-APC. Tal como se muestra en (A), se utilizó el anticuerpo humano anti-M2 de influenza a modo de control.
- 40 La figura 7 ilustra la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas. Se añadió hLIGHT soluble recombinante al medio de crecimiento de las células HT29.14s a concentraciones crecientes. Se recolectó el medio de crecimiento el día 3 después del tratamiento y se determinaron los niveles de CCL20 mediante ELISA. Las barras de error indican dos tratamientos independientes.
- 45 La figura 8 ilustra la secreción de IL-8 y RANTES mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas. Se añadió hLIGHT soluble recombinante, FNT, LTα1β2 y FLAG-BAP (a modo de control negativo) al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de diferentes pocillos los días 1, 2 y 3 después del tratamiento. SE determinaron los niveles de IL-8 y de RANTES mediante ELISA. Se utilizó fosfatasa alcalina bacteriana marcada con FLAG (FLAG-BAP) a modo de control negativo de proteína irrelevante marcado.
- 50 La figura 9A-9B muestra que los anticuerpos anti-HLIGHT inhiben la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas. (A) Se preincubó hLIGHT soluble recombinante (1 µg/ml) con anticuerpos anti-HLIGHT y se añadió al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de CCL20 mediante ELISA. Se incluyeron como controles medio solo, hLIGHT soluble solo, hLIGHT soluble incubado con anticuerpo anti-M2 de influenza y cada anticuerpo anti-HLIGHT solo. (B) Análisis de regresión no lineal de los datos representado en el panel A.
- 55 La figura 10A-10B muestra que los anticuerpos anti-HLIGHT humanos inhiben la secreción de RANTES mediada por hLIGHT expresada en la superficie celular a partir de células epiteliales colónicas humanas. (A)
- 60
- 65

Se preincubaron células EL4-HLIGHT fijadas con anticuerpo anti-HLIGHT y se añadieron al medio de crecimiento de células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de RANTES mediante ELISA. Se incluyeron como controles medio solo, células EL4-HLIGHT solas, hLIGHT soluble solo y cada anticuerpo anti-HLIGHT solo. (B) Gráfico de datos representados en (A).

La figura 11 ilustra los resultados de un experimento de bloqueo competitivo para la unión a hLIGHT.

La figura 12 ilustra la actividad de bloqueo de los anticuerpos de la unión de HVEM:Fc a las células 293 hLIGHT. Se sometieron a ensayo para su capacidad de bloquear la unión de HVEM:Fc a células 293 que expresan hLIGHT, anticuerpos monoclonales humanos anti-HLIGHT E1, E13 y F19, mAb de R&D y los anticuerpos policlonales de cabra anti-HLIGHT disponibles comercialmente (R&D Systems) y los anticuerpos policlonales de conejo anti-HLIGHT (eBioscience).

La figura 13 ilustra la actividad de bloqueo de los anticuerpos e la unión de RLTβ:Fc a las células 293 hLIGHT. Se sometieron a ensayo para su capacidad de bloquear la unión de RLTβ:Fc a células 293 que expresan hLIGHT, anticuerpos monoclonales anti-HLIGHT humanos E1 y E13, mAb de R&D y anticuerpos policlonales de cabra anti-HLIGHT disponibles comercialmente (R&D Systems) y anticuerpos policlonales de conejo anti-HLIGHT (eBioscience).

La figura 14 ilustra la actividad de bloqueo de los anticuerpos de (A) RLTβ:Fc y (B) unión de HVEM:Fc a células 293 hLIGHT y es una representación gráfica de los datos mostrados en las figuras 12 y 13.

La figura 15A-15B ilustra la unión de diversos anticuerpos anti-HLIGHT a hLIGHT soluble nativo o desnaturalizado. Se sometieron a ebullición cinco microgramos de LIGHT humano soluble en tampón de muestras SDS 2x (desnaturalizado) o no tratado (nativo) y después se diluyeron en serie ambos en incrementos de 6x. Se aplicaron en puntos 5 µl de cada dilución de hLIGHT simultáneamente sobre membranas de PVDF de 0,2 µm hidratadas (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando una pipeta de 8 canales. Se dejó que las membranas se secasen al aire y después se rehidrataron, se bloquearon (1x TBST (solución salina tamponada con Tris, Tween-20) + leche desnatada al 2,5% + azida sódica al 0,02%). Se sondeó cada membrana con 5 µg/ml de cada anticuerpo primario. Las membranas se lavaron 3x en 1x TBST seguido de anticuerpos secundarios biotinilados (biotina-α de cabra antihumano (Vector Labs, Burlingame, CA), biotina-α de cabra antiratón (Jackson Labs, Bar Harbor, Me), biotina-α de ratón anticabra (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) a una concentración de 5 µg/ml. Las membranas se lavaron 3x en 1x TBST seguido de super SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se utilizó la quimioluminiscencia para la detección utilizando el kit de detección de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se visualizó la señal mediante exposición a película de imágenes X-OMAT AR (Kodak, Rochester, New York). (A) Resultados de transferencia por puntos utilizando mAb humano anti-HLIGHT E1, E13, E63, F19 y F23 o dos anticuerpos monoclonales murinos anti-HLIGHT disponibles comercialmente de R&D Systems ("R&D mouse mAb") y Abnova ("Abnova mouse mAb"). A modo de control negativo se utilizó un anticuerpo anti-M2 (antígeno irrelevante). (B) Resultados de aplicación de puntos utilizando una preparación de anticuerpos policlonales de cabra anti-HLIGHT comerciales (R&D Systems "R&D goat pAb") o dos preparaciones de anticuerpos policlonales de conejo anti-HLIGHT comerciales (eBioscience ("eBioscience rabbit pAb") y Peprotech ("Peprotech rabbit pAb")).

La figura 16 ilustra la unión de diversos anticuerpos anti-HLIGHT a hLIGHT soluble nativo o desnaturalizado y resume los datos presentados en la figura 15 en forma de tabla.

La figura 17 muestra que los anticuerpos anti-LIGHT humanos de la invención inhiben la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas, mientras que los anticuerpos anti-HLIGHT de ratón disponibles comercialmente no la inhiben. La LIGHT human soluble recombinante (1 µg/ml) se preincubó con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14. Se recolectó el medio de crecimiento de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de CCL20 mediante ELISA. A modo de controles se incluyó medio solo, LIGHT soluble solo, LIGHT soluble incubado con anticuerpo anti-M2 de influenza, Ab B12 anti-LIGHT no bloqueante y cada anticuerpo anti-LIGHT solo. E1 y F19 son representantes de cada grupo de epítipo de bloqueo cruzado.

La figura 18 muestra que los anticuerpos humanos anti-LIGHT de la invención muestran secreción de RANTES mediada por LIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas, mientras que los anticuerpos de ratón anti-HLIGHT disponibles comercialmente no la muestran. Se preincubó LIGHT humana soluble recombinante (1 µg/ml) con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de RANTES mediante ELISA. A modo de controles se incluyó medio solo, LIGHT soluble solo, LIGHT soluble incubado con anticuerpo anti-M2 de influenza, Ab B12 anti-LIGHT no bloqueante y cada anticuerpo anti-LIGHT solo. E1 y F19 son representantes de cada grupo de epítipo de bloqueo cruzado.

Las figuras 19A-19B ilustran un análisis citométrico de la unión de hLIGHT expresado sobre la superficie celular a anticuerpos humanos anti-HLIGHT (A) E1 o (B) F19 en comparación con sus contrapartidas de cadena kappa individual recombinante de anticuerpo. Se incubaron células 293 expresantes de hLIGHT estables con cantidades crecientes de anticuerpos anti-LIGHT indicadas en la leyenda. Se detectó la unión a anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana-APC. SE purificaron los anticuerpos a partir de cultivos de hibridoma o de células 293F transfectados transitoriamente con vectores de expresión de mamífero codificantes de diferentes ADNc de cadena kappa emparejados con el gen de la cadena pesada. Se muestran los gráficos de los datos de medias geométricas de intensidad de fluorescencia junto con la regresión no lineal.

La figura 20 ilustra el bloqueo cruzado de anticuerpos mediante ELISA comparando anticuerpos de cadena kappa única con sus contrapartidas parentales. Este análisis define dos grupos basándose en la competición para la unión a hLIGHT mediante ELISA. Los anticuerpos individuales se utilizaron para recubrir los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se preincubó FLAG-HLIGHT soluble con anticuerpos anti-HLIGHT solubles y después se añadieron a los pocillos recubiertos. La unión de FLAG-HLIGHT al anticuerpo recubierto se detectó con anti-FLAG IgG-HRP. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la DO de cada muestra en la fórmula a continuación: % de inhibición=(max. – muestra/max.) x 100.

Las figuras 21A-21B ilustran el bloqueo de (A) HVEM humana:Fc o (B) RLTβ:Fc humano a hLIGHT nativo sobre la superficie celular por anticuerpo monoclonales anti-HLIGHT humanos y sus contrapartidas recombinantes de cadena kappa única. SE incubaron cantidades gradadas de anticuerpos con célula EL4-HLIGHT, HVEM:Fc humano biotinilado o RLTβ:Fc humano marcado con poliHis añadidos a una concentración sub-saturante y después se detectaron con SA-APC o anti-His-APC. Los anticuerpos se purificaron a partir de cultivos de hibridoma o células 293F transfectados transitoriamente con vectores de expresión de mamífero codificantes de los diferentes de ADNc de cadena kappa emparejadas con el gen de la cadena pesada.

La figura 22 ilustra la inhibición de la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas por anticuerpos humanos anti-LIGHT de cadena kappa única recombinante en comparación con los anticuerpos producidos por el hibridoma parental. Se preincubó LIGHT humano soluble recombinante (1 µg/ml) con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio decrecimiento a partir de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. SE determinaron los niveles de CCL20 mediante ELISA. A modo de controles se incluyó medio solo, LIGHT soluble solo (SHL), LIGHT soluble incubado con anticuerpo anti-M2 de influenza, o cada anticuerpo en ausencia de LIGHT soluble. Los anticuerpos denominados "E1k2" comprenden E1kappa(B) y "F19k2" comprende F19kappa(b).

La figura 23 muestra que los anticuerpos humanos anti-LIGHT de la invención inhiben la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales colónicas humanas, mientras que los anticuerpos de ratón anti-HLIGHT disponibles comercialmente no inhiben (Abnova) o inhiben sólo a concentraciones muy elevadas (100 µg/ml) (R&D). Se preincubó LIGHT humano soluble recombinante (1 µg/ml) con anticuerpos anti-LIGHT y se añadieron al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de los dos pocillos década tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de CCL20 mediante ELISA. A modo de controles se incluyó medio solo, LIGHT soluble solo (SHL), LIGHT soluble incubado con anticuerpo anti-M2 de influenza irrelevante, anti-albúmina sérica humana o cada anticuerpo en ausencia de LIGHT soluble. E1 y F19 son representantes de cada grupo de epítipo de bloqueo cruzado.

Las figuras 24A-24B ilustran la frecuencia alélica de determinadas variantes de hLIGHT de polimorfismo de nucleótido único (SNP) no sinónimo (A) codificantes de un ácido glutámico (E) o de lisina (K) en la posición aminoácida 214, o (B) codificantes de una leucina (L) o una serina (S) en la posición aminoácida 32 en diversas poblaciones étnicas.

La figura 25A-25D ilustra una titulación de dosis de la tinción de líneas celulares que expresan variantes SNP no sinónimas de LIGHT humana con los anticuerpos humanos anti-HLIGHT 124F23 y 124E1kappa(B). Se utilizaron cantidades gradadas de anticuerpos anti-HLIGHT para teñir células EL4-HLIGHT que expresaban la variante SNP (A) 214E-32S, (B) 214K-32S o (C) 214E-32L, detectados con anti-IgG humano-APC y se analizaron mediante citometría de flujo. (D) ilustra una titulación de dosis del bloqueo mediado por anticuerpo humano anti-LIGHT de HVEM humana:Fc (cuadrados) o RLTβ:Fc (triángulos) de unión a la variante SNP de LIGHT 214K-32S expresada sobre la superficie celular llevada a cabo tal como en la figura 5. Para (A)-(D) se determinó la media geométrica de la intensidad media de fluorescencia (IMF) y se aplicó un análisis de regresión no lineal.

Las figuras 26^a-26B ilustran un análisis de citometría de flujo de líneas celulares que expresan variantes SNP no sinónimas con anticuerpos anti-HLIGHT humanos. (A) La línea celular EL4-LIGHT SNP 214E y (B) la línea celular EL4 SNP 214K se tiñeron con una concentración (10 µg/ml) de cada anticuerpo anti-HLIGHT. Se detectó la unión con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana-APC. A modo de control negativo se

utilizó IgG humana de control de isotipo.

La figura 27 ilustra la inhibición de anticuerpo humano anti-HLIGHT de la secreción de RANTES mediada por variante SNP de hLIGHT expresada sobre la superficie celular, a partir de células epiteliales colónicas humanas. Se preincubó hLIGHT soluble recombinante (SHL) (1 µg/ml) o 5×10^4 células EL4-HLIGHT variantes SNP 214K o 214E con anticuerpos anti-HLIGHT y se añadieron al medio de crecimiento de las células HT29.14s. Se recolectó el medio de crecimiento de dos pocillos de cada tratamiento el día 3. Se determinaron los niveles de RANTES mediante ELISA. A modo de controles se incluyó medio solo, células EL4-LIGHT solas, LIGHT soluble solo y cada anticuerpo anti-HLIGHT solo.

La figura 28 ilustra una representación esquemática del modelo de EICH xenogénico agudo. Se inyectó en ratones SCID un anticuerpo IL2Rβ (TM-β1) el día 2 para reducir el número de células NK. El día 1, los ratones recibieron 2,5 Gy de irradiación subletal. El día 0, los ratones recibieron 10 millones de PBMC humanas mediante inyección intraperitoneal seguida inmediatamente por la inyección intravenosa de un anticuerpo humano anti-LIGHT humano o un anticuerpo de control negativo. Los ratones fueron pesados a intervalos de 3-4 días y el día 12 fueron sacrificados y se evaluó la patología macroscópica de los mismos. Se extirparon los bazo para el análisis de citometría de flujo, se extrajeron los ciegos para el análisis histológico y se recolectó suero para los análisis de citocinas y anticuerpos.

La figura 29 ilustra las puntuaciones de patología macroscópica observada en el modelo de enfermedad EICH xenogénica aguda murina. Se representan las puntuaciones de patología para la no inyección de anticuerpo monoclonal (círculos), la inyección de anticuerpo monoclonal anti-HLIGHT 124F23 (triángulos) y la inyección de anticuerpo monoclonal IgG1 humano de control (cuadrados). Las puntuaciones de 0, 1, 2 o 3 (nula, leve, moderada o grave, respectivamente) fueron asignadas a cada una de las tres categorías: diarrea, inflamación peritoneal/ascites e inflamación intestinal (puntuación total máxima: 9).

La figura 30 ilustra las puntuaciones de histopatología observadas en el modelo de enfermedad EICH xenogénica aguda murina. Se representan las puntuaciones de patología para ninguna inyección de MAb (círculos), la inyección de MAb anti-HLIGHT 124F23 (triángulos) y de MAb IgG1_h de control (cuadrados). Las puntuaciones de 0, 1, 2 o 3 (nula, leve, moderada o grave, respectivamente) fueron asignadas a cada una de las cuatro categorías siguientes: severidad de la inflamación, grado de inflamación, daño/atrofia de las vellosidades y porcentaje de afectación (puntuación total máxima: 12).

Las figuras 31A-31B ilustran secciones histológicas representativas de hematoxilina y eosina (H&E) de ciego de ratón en el estudio de EICH. (A) Sección de ciego de ratón tratado con MAb anti-LIGHT, y (B) ratón tratado con IgG humana de control. La involución de la submucosa indica ascites; las flechas discontinuas indican regiones de sangre y la flecha continua indica una región de infiltrado de linfocitos.

La figura 32 ilustra el número total de células T en el bazo de ratones en el estudio de EICH xenogénica. Los asteriscos indican valores de la prueba t de Student inferiores a 0,05 para las comparaciones entre los animales tratados con MAb anti-LIGHT y los controles.

Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además ácidos nucleicos aislados codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además vectores y células hospedadoras que comprenden ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además métodos de preparación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Se proporcionan además en la presente memoria un método de tratamiento o de control de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende administrar un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT.

Anticuerpos

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos, intracuerpos, Fv de cadena sencilla (scFv) (por ejemplo incluyendo monoespecíficos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos mediante disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriormente indicados.

En particular, entre los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se incluyen moléculas de

inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno hLIGHT. Las moléculas de inmunoglobulina proporcionados en la presente memoria pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En una forma de realización específica, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo IgG, preferentemente IgG1 o IgG4.

Entre las variantes y derivados de anticuerpos se incluyen fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un epítipo. Entre los fragmentos preferentes se incluyen fragmentos Fab (un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio de unión a antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada puenteada mediante un enlace disulfuro), Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un único dominio de unión a antígeno que comprende un Fab y una parte adicional de la cadena pesada mediante la región bisagra), F(ab')₂ (dos moléculas Fab' unidas mediante enlaces disulfuro inter-cadena en las regiones bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas Fab' pueden estar dirigidas al mismo epítipo o a epítipos diferentes), un Fab biespecífico (una molécula Fab que presenta dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede estar dirigido a un epítipo diferente), una cadena Fab de cadena sencilla que comprende una región variable, también conocida como sFv (la región variable determinante de la unión a antígeno de una única cadena ligera y una única cadena pesada de un anticuerpo unidas mediante un enlace disulfuro), un VH camelizado (la región variable determinante de la unión a antígeno de una única cadena pesada de un anticuerpo en el que algunos aminoácidos en la interfaz de VH son los presentes en la cadena pesada de los anticuerpos de camello naturales), un sFv biespecífico (un sFv o una molécula dsFv que presenta dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede estar dirigido a un epítipo diferente), un diacuerpo (un sFv dimerizado formado al ensamblarse el dominio VH de un primer sFv con el dominio VL de un segundo sFv y el dominio VL del primer sFv se ensambla con el dominio VH del segundo sFv; las dos regiones de unión a antígeno del diacuerpo pueden estar dirigidos al mismo epítipo o a epítipos diferentes) y un triacuerpo (un sFv trimerizado, formado de una manera similar a un diacuerpo pero en el que se crean tres dominios de unión a antígeno en un único complejo; los tres dominios de unión a antígeno pueden estar dirigidos al mismo epítipo o a diferentes epítipos). Entre los derivados de anticuerpos se incluyen además una o más secuencias de CDR de un sitio de combinación de anticuerpos. Las secuencias de CDR pueden estar unidas entre sí en un andamiaje en el caso de que se encuentren presentes dos o más secuencias de CDR. En determinadas formas de realización, el anticuerpo que debe utilizarse con la invención comprende un Fv de cadena sencilla ("scFv"). Los scFv son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios se encuentran presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión de antígenos. Para una revisión de los scFv, ver Pluckthun, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. nº 113, Rosenburg y Moore, editores, Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315, 1994.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, humanos, murinos, de burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Tal como se utiliza en la presente memoria, entre los anticuerpos "humanos" se incluyen anticuerpos que presentan la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de ratones que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

En formas de realización preferidas, los anticuerpos de la invención son anticuerpos totalmente humanos, tales como anticuerpos totalmente humanos que se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido hLIGHT, a un fragmento de polipéptido hLIGHT o a un epítipo de hLIGHT. Dichos anticuerpos totalmente humanos resultarían ventajosos respecto a anticuerpos totalmente de ratón (u otros anticuerpos total o parcialmente de una especie no humana), anticuerpos humanizados o anticuerpos híbridos, a fin de minimizar el desarrollo de efectos secundarios no deseados o innecesarios, tales como respuestas inmunológicas dirigidas contra anticuerpos no totalmente humanos (por ejemplo anticuerpos anti-hLIGHT derivados de otras especies) al administrarlos en el sujeto.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o de multiespecificidad superior. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítipos de un polipéptido hLIGHT o pueden ser específicos para tanto un polipéptido hLIGHT como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo material de soporte sólido. En formas de realización preferidas, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son mono-específicos para un epítipo dado de un polipéptido hLIGHT y/o se unen inmunoespecíficamente a otros epítipos.

En formas de realización preferidas, entre los anticuerpos de las composiciones que comprenden los anticuerpos y métodos de utilización de los anticuerpos de la presente exposición se incluyen un anticuerpo E1, E13, E63, F19 o F23 (ATCC nº de acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, respectivamente). En la presente memoria se proporcionan además hibridomas que producen anticuerpo E1, E13, E63, F19 o F23 (ATCC nº de acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, respectivamente) y/o otros anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT indicados en la presente memoria.

En determinadas formas de realización, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo aislado que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo hLIGHT por el anticuerpo resulta bloqueada competitivamente (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) por: (a) un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 o un anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o un anticuerpo F23, con la condición de que la unión al epítipo de LIGHT_ no resulte bloqueada por: (a) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F19, (b) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F23, (c) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F19, (d) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F23, (e) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F19, o (f) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F23. El anticuerpo puede ser o no un anticuerpo totalmente humano. En formas de realización preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo anti-hLIGHT monoclonal totalmente humano y todavía más preferentemente, un anticuerpo anti-hLIGHT antagonista monoclonal totalmente humano. En los Ejemplos en la presente memoria se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo ejemplificativos que pueden utilizarse.

En otras formas de realización, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo aislado, preferentemente un anticuerpo totalmente humano, que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueado (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) por: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13 o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o un anticuerpo F23. El anticuerpo puede ser o no un anticuerpo totalmente humano. En formas de realización preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo anti-LIGHT_ monoclonal totalmente humano y todavía más preferentemente, un anticuerpo anti-hLIGHT antagonista monoclonal totalmente humano. En los Ejemplos en la presente memoria se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo ejemplificativos que pueden utilizarse.

En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria compiten (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) con HVEM, RLTβ y/o DcR3 (o una o más proteínas de fusión de los mismos) para la unión a hLIGHT expresado sobre la superficie celular. En otras formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria compiten (por ejemplo de una manera dependiente de la dosis) con HVEM, RLTβ y/o DcR3 (o una o más proteínas de fusión de los mismos) para la unión a hLIGHT soluble. En los Ejemplos en la presente memoria se proporcionan ensayos de unión competitiva ejemplificativos que pueden utilizarse. En una forma de realización, el anticuerpo inhibe parcial o completamente la unión de HVEM, RLTβ y/o DcR3 a hLIGHT expresado sobre la superficie celular, tal como hLIGHT. En otra forma de realización, el anticuerpo inhibe parcial o completamente la unión de HVEM, RLTβ y/o DcR3 a hLIGHT soluble. En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria inhiben parcial o completamente la secreción de CCL20, IL-8 y/o RANTES a partir de una célula que presenta ligando de hLIGHT expresado sobre la superficie celular, tal como un receptor de hLIGHT (por ejemplo, HVEM, RLTβ y/o DcR3). En determinadas realizaciones, la célula que expresa el receptor de hLIGHT es una célula epitelial colónica.

Entre los anticuerpos de la presente exposición se incluyen aquellos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos siguientes: anticuerpo E1 (ATCC nº de acceso PTA-7229), anticuerpo E13 (ATCC nº de acceso PTA-7842) o anticuerpo E63 (ATCC nº PTA-7818), anticuerpo F19 (ATCC nº de acceso PTA-7819) o anticuerpo F23 (ATCC nº de acceso PTA-7728), la sección de Ejemplos y en otros sitios en la solicitud. En una forma de realización específica, un anticuerpo de la presente exposición es un anticuerpo E1, E13, E63, F19 o F23. En otra forma de realización, un anticuerpo de la exposición comprende un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab) de E1, E13, E63, F19 o F23.

Preferentemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales totalmente humanos, tales como anticuerpos antagonistas monoclonales totalmente humanos, que se unen inmuno-específicamente a hLIGHT.

En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se unen a un epítipo de hLIGHT que es un elemento de superficie tridimensional de un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, en una forma trimérica de un polipéptido hLIGHT). Una región de un polipéptido hLIGHT que contribuye un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede reunirse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. Un epítipo de hLIGHT puede encontrarse presente en (a) la forma trimérica ("un epítipo de hLIGHT trimérico") de hLIGHT, (b) la forma monomérica ("un epítipo de hLIGHT monomérico") de hLIGHT, (c) tanto la forma trimérica como la forma monomérica de hLIGHT, (d) la forma trimérica pero no la forma monomérica de hLIGHT, o (e) la forma monomérica pero no la forma trimérica de hLIGHT.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, el epítipo únicamente se encuentra presente o disponible para la unión en la forma trimérica (nativa), pero no se encuentra presente o disponible para la unión en la forma monomérica (desnaturalizada) por un anticuerpo anti-hLIGHT. En otras formas de realización, el epítipo de hLIGHT es un elemento lineal del polipéptido hLIGHT (por ejemplo en una forma trimérica o forma monomérica del polipéptido hLIGHT). Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria pueden unirse inmuno-específicamente a (a) un epítipo de la forma monomérica de hLIGHT, (b) un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT, (c) un epítipo de la forma monomérica pero no de la forma trimérica de hLIGHT, (d) un epítipo de la forma trimérica pero no de la forma monomérica de hLIGHT, o (e) tanto la forma monomérica como la forma trimérica de hLIGHT. En formas de realización preferidas, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se unen inmuno-específicamente a un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT pero no se unen inmuno-específicamente a un epítipo de la forma monomérica de hLIGHT.

En una forma de realización específica, la presente exposición proporciona uno o más anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena VH y/o cadena VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una cadena VH y/o cadena VL de un anticuerpo E1, E13, E63 F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta los nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728.

En otra forma de realización, la presente exposición proporciona uno o más anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio VH y/o dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un dominio VH y/o dominio VL del anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta los nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728.

En otra forma de realización, la presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno, dos, tres o más CDR que presentan la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más CDR del anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta los nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728.

En una forma de realización, la presente exposición proporciona uno o más anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una combinación de CDR de VH y/o CDR de VL que presentan la secuencia de aminoácidos de las CDR de VH y/o las CDR de VL de E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta los nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728.

La presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena VH y/o VL que presenta una secuencia de aminoácidos de una cadena VH y/o VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) un anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23, con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no resulta bloqueada por: (a) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F19, (b) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F23, (c) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F19, (d) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F23, (e) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F19, o (f) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F23.

La presente exposición proporciona además anticuerpos totalmente humanos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena VH y/o una cadena VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una cadena VH y/o de una cadena VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) anticuerpo E1, anticuerpo E13 o anticuerpo E63, o (b) el anticuerpo F19 o F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio VH y/o dominio VL que presenta una secuencia de aminoácidos de un dominio VH y/o dominio VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) un anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23, con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no resulte bloqueada por ambos de: (a) los anticuerpos E1 y F19, (b) los anticuerpos E1 y F23, (c) los anticuerpos E13 y F19, (d) los anticuerpos E13 y F23, (e) los anticuerpos E63 y F19, o (f) los anticuerpos E63 y F23.

La presente exposición proporciona además anticuerpos totalmente humanos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio VH y/o dominio VL que presenta una secuencia de aminoácidos de un dominio VH y/o dominio VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) el anticuerpo E1, el anticuerpo E13 o el anticuerpo E63, o (b) el anticuerpo F19 o el anticuerpo F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una, dos o tres CDR de VH (es decir, CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH) presentando la secuencia de aminoácidos una, dos o tres CDR de VH, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) el

anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) el anticuerpo F19 o F23, con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no resulte bloqueada por ambos de: (a) los anticuerpos E1 y F19, (b) los anticuerpos E1 y F23, (c) los anticuerpos E13 y F19, (d) los anticuerpos E13 y F23, (e) los anticuerpos E63 y F19, o (f) los anticuerpos E63 y F23.

La presente exposición proporciona además anticuerpos totalmente humanos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo uno, dos o tres CDR de VH (es decir, CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH) presentando la secuencia de aminoácidos una, dos o tres CDR de VH, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) el anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) el anticuerpo F19 o F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una, dos o tres CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) presentando la secuencia de aminoácidos una, dos o tres CDR de VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) el anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) el anticuerpo F19 o F23, con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no resulte bloqueada por ambos de: (a) los anticuerpos E1 y F19 (b) los anticuerpos E1 y F23, (c) los anticuerpos E13 y F19, (d) los anticuerpos E13 y F23, (e) los anticuerpos E63 y F19, o (f) los anticuerpos E63 y F23.

La presente exposición proporciona además anticuerpos totalmente humanos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una, dos o tres CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) en los que la secuencia de aminoácidos presenta una, dos o tres CDR de VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo resulta competitivamente bloqueada de una manera dependiente de la dosis por: (a) el anticuerpo E1, E13 o E63, o (b) el anticuerpo F19 o F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente exposición proporciona además anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una o más CDR de VH (es decir, CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH), que presentan una secuencia de aminoácidos cualquiera de entre las CDR de VH (es decir, CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH) de E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un híbrido con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprenden un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos del dominio VH ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5 y/o un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos del dominio VL ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91 o 10.

En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende: (a) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 1 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 82, 6 o 83, (b) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 2 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 7, (c) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 3 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 8, (d) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 4 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 90, 9, 91 o 92, o (e) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 5 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 10. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En otra forma de realización, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprenden un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos del dominio VH de un anticuerpo con los nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o un dominio VL con la secuencia de aminoácidos del dominio VL de un anticuerpo con los nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende: (a) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7719 (E1) y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con

el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1), (b) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13) y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13), (c) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63) y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63), (d) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19) y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (e) un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23) y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR1 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR2 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR1 de VH y/o una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH seleccionada independientemente de entre una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, tal como se ilustra en cualquiera de las regiones VH mostradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5.

La presente exposición proporciona además anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una o más CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) que presentan una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) de E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende: (1) un dominio VH que presenta (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 11, 12 y/o 13, respectivamente, (b) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 14, 15 y/o 16, respectivamente, (c) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 17, 18 y/o 19, respectivamente, (d) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 20, 21 y/o 22, respectivamente, o (e) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 23, 24 y/o 24, respectivamente, y/o (2) un dominio VL que presenta: (a) una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 84, 26 o 85, una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 88, 28 o 89, (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 29, 30 y/o 31, respectivamente, (c) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 32, 33 y/o 34, respectivamente, (d) una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 93, 35, 94 o 95, y/o una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, o (e) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende: (1) un dominio VH que presenta (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1), (b) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13), (c) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63), (d) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (F19), o (e) una CDR de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23), y/o (2) un dominio VL que presenta: (a) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13), (c) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el

nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63), (d) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (e) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En determinadas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende: (1) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 11, 12 y/o 13, respectivamente, y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 84, 26 o 85; una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquier de entre las SEC ID nº 86, 27 o 87, y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 88, 28 o 89; (2) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 14, 15 y/o 16, respectivamente, y (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 29, 30 y/o 31, respectivamente; (3) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 17, 18 y/o 19, respectivamente, y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 32, 33 y/o 34, respectivamente; (4) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 20, 21 y/o 22, respectivamente, y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 93, 35, 94 o 95; una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 93, 35, 94 o 95; una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 96, 36, 9 o 98, y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de entre las SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, o (5) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 23, 24 y/o 24, respectivamente, y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos ilustrada en las SEC ID nº 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende (1) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1), y (b) un dominio VL con una CR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1); (2) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de V de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13), y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso de la ATCC PTA-7842 (E13); (3) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63), y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63); (4) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19) y una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (5) (a) un dominio VH con una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23), y (b) un dominio VL con una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En otra forma de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En otra forma de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de L de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, , 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un

anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden una CDR1 de VL y/o una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL seleccionado independientemente de entre CR1 de VL, una CDR2 de VL y CDR3 de VL tal como se ilustra en cualquiera de las regiones VL ilustrada en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la exposición comprenden (1) un dominio o cadena VH que presenta uno o más de entre: (a) una CDR1 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH de cualquiera de las regiones VH con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), o (c) una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o 2) un dominio o cadena VL que presenta uno o más de entre: (a) una CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10 o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o (c) una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Tabla 1

Antic.	VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
E1	(SEC ID nº 1)	RFNMN (SEC ID nº 11)	YISSSTIYYADSKVKG (SEC ID nº 12)	SIAAFDY (SEC ID nº 13)	(SEC ID nº 82, 6*, 83)	RASQGISSALA (SEC ID nº 84) RASQSVSSSYLT (SEC ID nº 26*) RASQSVSSSYLA (SEC ID nº 85)	DASSLES (SEC ID nº 86) GASSRAT (SEC ID nº 37*) GASNRA (SEC ID nº 87)	QQFNSYRT (SEC ID nº 88) QQYGSSMYT (SEC ID nº 28*) QQYGSSPWT (SEC ID nº 89)
E13	(SEC ID nº 2)	NAWMS (SEC ID nº 14)	RIKSKIDGGTTDYAAPVKG (SEC ID nº 15)	AMAGAFGF (SEC ID nº 16)	(SEC ID nº 7)	RASQSVSSSYLA (SEC ID nº 29)	GASSRAT (SEC ID nº 30)	QQYGSSPMYT (SEC ID nº 31)
E63	(SEC ID nº 3)	SGGYWWS (SEC ID nº 17)	YIYSGSTNYPNPSLKS (SEC ID nº 18)	WITMFRGVGFDP (SEC ID nº 19)	(SEC ID nº 8)	RASQIGSSLH (SEC ID nº 32)	YASQSES (SEC ID nº 33)	HQSSSLPLT (SEC ID nº 34)
F19	(SEC ID nº 4)	GYNWH (SEC ID nº 20)	EITHSGSTNYPNPSLKS (SEC ID nº 21)	EIAVAGTGYGMDV (SEC ID nº 22)	(SEC ID nº 90, 9*, 91, 92)	RVSQGISYLN (SEC ID nº 93) RASRGINSFA (SEC ID nº 35*) RMSQGISSYLA (SEC ID nº 94) RASQGVSSSYLA (SEC ID nº 95)	SASNLQS (SEC ID nº 96) DASSLES (SEC ID nº 36*) AASLQS (SEC ID nº 97) DASWRAT (SEC ID nº 98)	QRTJNAPPT (SEC ID nº 99) QQFNSYPLT (SEC ID nº 37*) QQYYSFPYT (SEC ID nº 100) QQRSNWHP (SEC ID nº 101)
F23	(SEC ID nº 5)	GYWN (SEC ID nº 23)	EINQYNPSLKS (SEC ID nº 24)	EIATADKGYGLDV (SEC ID nº 25)	(SEC ID nº 10)	RASQGISSALA (SEC ID nº 38)	DASSLES (SEC ID nº 39)	QQFNSYPLT (SEC ID nº 40)

*secuencias preferidas de VL y de CDR1-3 de VL de E1 y F19.

[illegible]

7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23), también pueden utilizarse en cualquiera de las combinaciones presentadas anteriormente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente exposición proporciona además anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de LIGH_h, comprendiendo los anticuerpos derivados del dominio VH, CDR de VH, dominios VL y CDR de VL indicados en la presente memoria que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT. La presente exposición proporciona además anticuerpos que comprenden derivados de E1, E13, E63, F19 y/o F23, en la que dichos anticuerpos se unen inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT. Pueden utilizarse técnicas estándares conocidas del experto en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos codificante de una molécula de la invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR que resulta en sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la molécula original. En una forma de realización preferente, los derivados presentan sustituciones de aminoácidos conservadas en uno o más residuos aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo aminoácido es sustituido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral con carga similar. Las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales con cargas similares han sido definidas en la técnica. Entre estas familias se incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Alternativamente, puede introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica con el fin de identificar mutantes que conservan actividad. Tras la mutagénesis, puede expresarse la proteína codificada y determinarse la actividad de la proteína.

En otra forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de E1, E13, E63, F19 y/o F23, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un dominio VH, dominio VL, cadena VH o cadena VL. En una forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99%, idéntica a una secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID n° 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID n° 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10. En otra forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99% a una secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID n° 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10. En todavía otra forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos de CDR de VH y/o de una CDR de VL que es por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos de CDR de VH ilustradas en las SEC ID n° 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 (CDR de VH) y/o una secuencia de aminoácidos de CDR de VL ilustrada en la SEC ID n° 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 o 40.

En formas de realización específicas, el anticuerpo es un anticuerpo antihumano totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano. Pueden producirse anticuerpos totalmente humanos mediante cualquier método conocido de la técnica. Entre los métodos ejemplificativos se incluyen la inmunización con un antígeno hLIGHT (cualquier polipéptido hLIGHT capaz de inducir una respuesta inmunológica y opcionalmente conjugado con un portador) de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas; ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551, 1993; Jakobovits *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Bruggermann *et al.*, Year in Immunol. 7:33, 1993. Pueden encontrarse otros métodos de producción de

anticuerpos anti-HLIGHT totalmente humanos en los Ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Alternativamente, pueden generarse anticuerpos totalmente humanos mediante el cribado *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos de expresión fágica; ver, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227:381, 1991; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581, 1991. Se han descrito diversas bibliotecas de expresión fágica que contienen anticuerpos y pueden ser fácilmente preparadas por el experto en la materia. Las bibliotecas pueden contener una diversidad de secuencias de anticuerpo humano, tal como fragmentos Fab, Fv y scFv humanos que pueden cribarse frente a una diana apropiada.

En formas de realización preferidas, los anticuerpos utilizados según los métodos de la invención presentan una elevada afinidad para un polipéptido hLIGHT o fragmento de polipéptido o epítipo del mismo. En una forma de realización, los anticuerpos utilizados según los métodos de la invención presentan una afinidad más elevada para un anticuerpo de hLIGHT que los anticuerpos conocidos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente comentados en otros sitios de la presente memoria). En una forma de realización específica, los anticuerpos utilizados según los métodos de la invención presentan una afinidad 2 a 10 veces (o más) superior para un antígeno hLIGHT que un anticuerpo anti-HLIGHT conocido según evaluación mediante las técnicas indicadas en la presente memoria o conocidas por el experto en la materia (por ejemplo, un ensayo BIAcore). Según dichas formas de realización, la afinidad de los anticuerpos se evalúa, en una forma de realización, mediante un ensayo BIAcore.

En una forma de realización específica, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio VH y/o una secuencia de aminoácidos de un dominio VL codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con: (1) el complemento de una secuencia de nucleótidos codificante de cualquiera de los dominios VH y/o VL ilustrados en SEC ID nº 41, 42, 43, 44 o 45 (VH) y/o SEC ID nº 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 o 50 (VL) o (2) el complemento de una secuencia de nucleótidos codificante de cualquiera de los dominios VH o VL de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) bajo condiciones restrictivas (por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/SDS al 0,1% a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y 65°C) bajo condiciones altamente restrictivas (por ejemplo, la hibridación a ácidos nucleicos unidos a filtro en 6x SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1x SSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 68°C) o bajo otras condiciones de hibridación restrictivas que son conocidas por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Ausubel F.M. *et al.*, editores, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

En otra forma de realización, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos de una CDR de VH o una secuencia de aminoácidos de una CDR de VL codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento de una secuencia de nucleótidos codificante de cualquiera de las CDR de VH y/o de las CDR de VL ilustradas en las SEC ID nº 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 (CDR de VH) y/o SEC ID nº 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 o 40 (CDR de VL) o (b) el complemento de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de cualquiera de las CDR de VH y/o de las CDR de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) bajo condiciones restrictivas (por ejemplo la hibridación a ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/SDS al 0,1% a una temperatura de entre aproximadamente 50°C y 65°C), bajo condiciones altamente restrictivas (por ejemplo, la hibridación a ácidos nucleicos unidos a un filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 68°C) o bajo otras condiciones de hibridación restrictivas que son conocidas por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Ausubel F.M. *et al.*, editores, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen anticuerpos que han sido químicamente modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, aunque no a título limitativo, entre los derivados de anticuerpo se incluyen anticuerpos que han sido modificados químicamente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, corte proteolítico, enlace a un ligando celular o a otras proteínas, etc. Puede llevarse a cabo cualesquiera de entre numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, corte químico específico, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT que comprende una región marco conocida por el experto en la materia (por ejemplo, un fragmento humano o no humano). La región marco puede ser, por ejemplo, regiones marco naturales o de consenso. Más preferentemente, la región marco de un anticuerpo de la invención es humana (ver, por ejemplo, Chothia *et al.*, J.

Mol. Biol. 278:457-479, 1998, para un listado de regiones marco humanas). Ver también Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.), 5a edición, 1991.

- 5 En una forma de realización específica, la presente exposición proporciona anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR de E1, E13, E63, F19 y/o F23 (es decir, SEC ID nº 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 (CDR de VH) o SEC ID nº 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 o 40 (CDR de VL) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, y regiones marco humanas con una o más sustituciones de aminoácidos en uno, dos, tres o más de los residuos siguientes: (a) residuos de marco raros que difieren entre el marco de anticuerpo murino (es decir, el marco de anticuerpo donante) y el marco de anticuerpo humano (es decir, el marco de anticuerpo aceptor), (b) residuos de zona Venier en el caso de que difieran entre el marco de anticuerpo donante y el marco de anticuerpo aceptor, (c) residuos de empaquetamiento inter-cadena en la interfaz VH/VL que difieren entre el marco de anticuerpo donante y el marco de anticuerpo aceptor, (d) residuos canónicos que difieren entre las secuencias del marco de anticuerpo donante y del marco de anticuerpo aceptor, en particular las regiones marco cruciales para la definición de la clase canónica de bucles de CDR del anticuerpo murino, (e) residuos que son contiguos a un CDR, (g) residuos capaces de interactuar con el antígeno, (h) residuos capaces de interactuar con la CDR, e (i) residuos de contacto entre el dominio VH y el dominio VL. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT que comprende las regiones marco humanas con una o más sustituciones de aminoácidos en uno, dos, tres o más de los residuos anteriormente identificados son anticuerpos de hLIGHT antagonistas.
- 10
- 15
- 20
- 25 La presente exposición comprende anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos del dominio VH y/o del dominio VL o un fragmento de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo producido por el hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728) o de un anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23, que presenta mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT comprenden la secuencia de aminoácidos del dominio VH y/o del dominio VL o un fragmento de unión a antígeno de la misma de E1, E13, E63, F19 y/o F23 con una o más sustituciones de residuos aminoácidos en las regiones marco de los dominios VH y/o VL.
- 30
- 35 La presente exposición comprende además anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos del dominio VH y/o del dominio VL de un anticuerpo producido por el hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, o de un anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23, que presenta mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de residuos aminoácidos) en las regiones hipervariable y de marco. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos en las regiones marco mejoran la unión del anticuerpo a un antígeno hLIGHT.
- 40
- En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria reducen o inhiben la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DcR3, y/o reducen o inhiben una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano). En determinadas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, tal como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT humano, reducen o inhiben la unión de un hLIGHT soluble o expresado sobre la superficie celular a HVEM o RLTβ, y/o reduce o inhibe la secreción de CCL20 y/o RANTES tras el contacto con un hLIGHT soluble o expresado sobre la superficie celular, en un sujeto. En algunas formas de realización, el hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. La actividad de bloqueo de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria de la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DCR3 puede detectarse utilizando un ensayo tal como el indicado en cualquiera de los Ejemplos 1 a 4. La inhibición de la actividad biológica de las células que expresan un receptor de hLIGHT por un anticuerpo de hLIGHT proporcionado en la presente memoria puede detectarse utilizando un ensayo tal como el descrito en cualquiera de los Ejemplos 1 a 4.
- 45
- 50
- 55 En otras formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria reducen o inhiben la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DcR3 y/o reducen o inhiben una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que presenta un receptor de hLIGHT expresado sobre la superficie celular (tal como HVEM, RLTβ y/o Dc3R). En determinadas formas de realización, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria, tales como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT humano, reducen o inhiben la unión de un hLIGHT soluble o expresado sobre la superficie celular a HVEM o RLTβ, y/o reducen o inhiben la secreción de CCL20 y/o RANTES, en una célula que presenta un receptor de hLIGHT expresado sobre la superficie celular tras el contacto con un hLIGHT soluble o expresado sobre la superficie celular. En algunas formas de realización, el hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. La actividad de bloqueo de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria de unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DCR3 puede detectarse utilizando un ensayo tal como se describe en cualquiera de
- 60
- 65

los Ejemplos 1 a 4. La inhibición de la actividad biológica de las células que expresan un receptor de hLIGHT por un anticuerpo de hLIGHT proporcionado en la presente memoria puede detectarse utilizando un ensayo tal como el descrito en cualquiera de los Ejemplos 1 a 4.

- 5 La presente invención proporciona además proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo proporcionado en la presente memoria que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT y a un polipéptido heterólogo. En algunas formas de realización, el polipéptido heterólogo al que se fusiona el anticuerpo resulta útil para dirigir el anticuerpo a células que presentan hLIGHT expresado sobre la superficie celular.
- 10 La presente exposición proporciona además paneles de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT. En formas de realización específicas, la exposición proporciona paneles de anticuerpos que presentan diferentes constantes de tasa de asociación, diferentes constantes de tasa de disociación, diferentes afinidades para el antígeno hLIGHT y/o diferentes especificidades para un antígeno hLIGHT. La exposición proporciona paneles de aproximadamente 10, preferentemente de aproximadamente 25, aproximadamente 50,
- 15 aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700, aproximadamente 750, aproximadamente 800, aproximadamente 850, aproximadamente 900, aproximadamente 950 o aproximadamente 1.000 anticuerpos o más. Pueden utilizarse paneles de anticuerpos, por ejemplo, en placas de 96 pocillos o de 384 pocillos, tal como para ensayos tales como los ELISA.
- 20

Conjugados de anticuerpos y proteínas de fusión

- 25 En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se conjugan o se fusionan recombinantemente con un agente diagnóstico, detectable o terapéutico o cualquier otra molécula. Los anticuerpos conjugados o fusionados recombinantemente pueden resultar útiles, por ejemplo, para realizar el seguimiento o pronóstico de la aparición, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad mediada por hLIGHT como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia particular.
- 30

Dicho diagnóstico y detección puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables, incluyendo, aunque sin limitación, diversos enzimas, tales como, aunque sin limitarse a ellos, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, aunque sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, aunque sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficeitrina; materiales luminiscentes, tales como, aunque sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, aunque sin limitación, luciferasa, luciferina y acuorina; materiales radioactivos, tales como, aunque sin limitación, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I e ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In e ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Sn , y metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

35

40

- 45 La presente invención comprende además la utilización de los anticuerpos de la invención conjugados o fusionados recombinantemente con una fracción terapéutica (o una o más fracciones terapéuticas). El anticuerpo puede conjugarse o fusionarse recombinantemente con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ejemplo, los emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que resulte perjudicial para las células.
- 50 Entre las fracciones terapéuticas se incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina); agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) y cisplatino); antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina); antibióticos (por ejemplo actinomicina d (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)); moléculas de auristatina (por ejemplo auristatina PHE, briostatina 1 y solastatina 10; ver Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8, 2002; Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4, 2001; Mohammad *et al.*, Anticancer Drugs 12:735-40, 2001; Wall *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80, 1999; Mohammad *et al.*, Int. J. Oncol. 15:367-72, 1999; hormonas (por ejemplo, glucocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos), inhibidores de enzimas de reparación del ADN (por ejemplo, etopósido o topotecán), inhibidores de cinasa (por ejemplo, el compuesto ST1571 y el mesilato de imatinib (Kantarjian *et al.*, Clin. Cancer Res. 8(7):2167-76, 2002)), agentes citotóxicos (por ejemplo, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrottestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos, y los compuestos dados a conocer en las patentes US nº 6.245.759, 6.399.633, 6.383.790, 6.335.156, 6.271.242, 6.242.196, 6.218.410.
- 55
- 60
- 65

6.218.372, 6.057.300, 6.034.053, 5.985.877, 5.958.769, 5.925.376, 5.922.844, 5.911.995, 5.872.223, 5.863.904, 5.840.745, 5.728.868, 5.648.239, 5.587.459); inhibidores de la farnesil transferasa (por ejemplo, R115777, BMS-214662 y los dados a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 6.458.935, 6.451.812, 6.440.974, 6.436.960, 6.432.959, 6.420.387, 6.414.145, 6.410.541, 6.410.539, 6.403.581, 6.399.615, 6.387.905, 6.372.747, 6.369.034, 6.362.188, 6.342.765, 6.342.487, 6.300.501, 6.268.363, 6.265.422, 6.248.756, 6.239.140, 6.232.338, 6.228.865, 6.228.856, 6.225.322, 6.218.406, 6.211.193, 6.187.786, 6.169.096, 6.159.984, 6.143.766, 6.133.303, 6.127.366, 6.124.465, 6.124.295, 6.103.723, 6.093.737, 6.090.948, 6.080.870, 6.077.853, 6.071.935, 6.066.738, 6.063.930, 6.054.466, 6.051.582, 6.051.574 y 6.040.305); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina, irinotecán, SN-38, topotecán, 9-aminocamptotecina, GG-211 (GI 147211), DX-8951f, IST-622, rubitecán, pirazoloacridina, XR-5000, saintopina, UCE6, UCE1022, TAN-1518A, TAN 1518B, KT6006, KT6528, ED-110, NB-506, ED-110, NB-506 y rebecamicina), bulgareína, ligantes de surco menor del ADN, tales como los pigmentos Hoescht 33342 y Hoechst 33258, nitidina, fagaronina, epiberberina, coralina, beta-lapachona, BC-4-1, bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato, cimadronato, clodronato, tiludronato, etidronato, ibandronato, neridronato, olpandronato, risedronato, piridronato, pamidronato y zolendronato), inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, estatina, cerivastatina, lescol, lupitor, rosuvastatina y atorvastatina), oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, los dados a conocer en las patentes US nº 6.277.832, 5.998.596, 5.885.834, 5.734.033 y 5.618.709), inhibidores de la adenosina desaminasa (por ejemplo, fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina), ibritumomab tiuxetán (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®) y sales, solvatos y clatratos farmacéuticamente aceptables, y profármacos de los mismos.

Además, un anticuerpo de la invención puede conjugarse o fusionarse recombinantemente con una fracción terapéutica o fracción de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Las fracciones terapéuticas o fracciones de fármaco no deben interpretarse como limitadas a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína, péptido o polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Entre dichas proteínas puede incluirse, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína, tal como factor de necrosis tumoral, interferón γ , interferón α , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo FNT- γ , FNT- γ , AIM I (ver la publicación de patente internacional nº WO 97/33899), AIM II (ver la publicación de patente internacional nº WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi *et al.*, *J. Immunol.* 6:1567-1574, 1994) y VEGF (ver la publicación de patente internacional nº WO 99/23105), un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina, endostatina o un componente de la ruta de coagulación (por ejemplo, factor tisular) o un modificador de la respuesta biológica, tal como, por ejemplo, una linfoquina (por ejemplo, interferón gamma, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-5 ("IL-5"), interleucina-6 ("IL-6"), interleucina-7 ("IL-7"), interleucina-9 ("IL-9"), interleucina-10 ("IL-10"), interleucina-12 ("IL-12"), interleucina-15 ("IL-15"), interleucina-23 ("IL-23"), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") o un factor de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento ("FC"), o un agente de coagulación (por ejemplo, calcio, vitamina K, factores tisulares, tales como, aunque sin limitación, factor de Hageman (factor XII), quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK), proteínas de coagulación-factores II (protrombina), factor V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, Xla, IX, IXa, X, fosfolípido y monómero de fibrina).

La presente invención comprende anticuerpos de la invención fusionados recombinantemente o conjugados químicamente (conjugaciones covalentes o no covalentes) con una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, preferentemente con un polipéptido de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, un dominio VH, una CDR de VH, un dominio VL o una CDR de VL) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogo. En una forma de realización, la proteína, polipéptido o péptido heterólogo al que se encuentra fusionado el anticuerpo resulta útil para dirigir el anticuerpo a un tipo celular particular, tal como una célula que expresa hLIGHT o un receptor de hLIGHT. Por ejemplo, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un receptor de superficie celular expresado por un tipo celular particular (por ejemplo, una célula inmunológica) puede fusionarse o conjugarse con un anticuerpo modificado de la invención.

Una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende cualquier anticuerpo de la invención indicado en la presente memoria y un polipéptido heterólogo. En una forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende anticuerpo E1, E13, E63, F19 o F23, o un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo. En otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende un fragmento de unión a antígeno de E1, E13, E63, F19 o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo. En otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VH ilustrados en las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y/o un

dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VL ilustrados en la SEC ID nº 82, 6, 3, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo.

En otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la presente exposición comprende una o más CDR de VH que presentan la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VH ilustradas en la SEC ID nº 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo. En otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión comprende una o más CDR de VL que presentan la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL ilustradas en SEC ID nº 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 o 40, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo. En otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende por lo menos un dominio VH y por lo menos un dominio VL ilustrados en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5 y SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente, de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo. En todavía otra forma de realización, una proteína conjugada o de fusión de la exposición comprende por lo menos una CDR de VH y por lo menos una CDR de VL ilustrada en SEC ID nº 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 y SEC ID nº 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39 o 40, respectivamente, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y un polipéptido heterólogo.

Además, puede conjugarse un anticuerpo de la invención con fracciones terapéuticas, tales como un ion de metal radioactivo, tal como emisores alfa, tales como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo, aunque sin limitación, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho y ^{131}Sm , con polipéptidos. En determinadas formas de realización, el quelante macrocíclico es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecán-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son conocidas comúnmente de la técnica y se describen en Denardo *et al.*, Clin. Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Peterson *et al.*, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999, y Zimmerman *et al.*, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999.

Además, pueden fusionarse anticuerpos de la invención con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En formas de realización preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc.), entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente. Tal como se indica en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Entre otros marcadores peptídicos útiles para la purificación se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, el marcador hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984) y el marcador "FLAG".

Los métodos para fusionar o conjugar fracciones terapéuticas (incluyendo polipéptidos) con anticuerpos son bien conocidos; ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy", Reisfeld *et al.* (editores), páginas 243 a 56 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en: Controlled Drug Delivery (2a ed.), Robinson *et al.* (editores), páginas 623 a 653 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (editores), páginas 475 a 506, 1985; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (editores), páginas 303 a 316 (Academic Press, 1985); Thorpe *et al.*, Immunol. Rev. 62:119-58, 1982; patentes US nº 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095 y 5.112.946; patentes nº EP 307.434, EP 367.166, EP 394.827; publicaciones de patente PCT nº WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 y WO 99/04813; Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Traunecker *et al.*, Nature, 331:84-86, 1988; Zheng *et al.*, J. Immunol., 154:5590-5600, 1995, y Vil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341, 1992.

Pueden generarse proteínas de fusión mediante, por ejemplo, las técnicas de transposiciones génicas ("gene shuffling"), transposiciones de motivos, transposiciones de exones y/o transposiciones de codones (colectivamente denominadas "transposiciones de ADN", en inglés "DNA shuffling"). Las transposiciones de ADN pueden utilizarse para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Ver, generalmente, las patentes US nº 5.605.793, nº 5.811.238, nº 5.830.721, nº 5.834.252 y nº 5.837.458; Patten *et al.*, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33, 1997; Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82, 1998; Hansson *et al.*, J. Mol. Biol. 287:265-76, 1999, y Lorenzo y Blasco, Biotechniques 24(2):308-313, 1998. Los anticuerpos o los anticuerpos codificados pueden alterarse sometiendo a mutagénesis aleatoria mediante PCR con tendencia a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Puede recombinarse un polinucleótido codificante de un anticuerpo de la invención con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o

más moléculas heterólogas.

Un anticuerpo de la invención también puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos, tal como se indica en la patente US nº 4.676.980.

La fracción terapéutica o fármaco conjugado o fusionado recombinantemente con un anticuerpo de la invención que se une inmuno específicamente con un antígeno hLIGHT debe seleccionarse para conseguir el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos deseados. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo modificado. Un método u otro personal médico debería considerar los criterios siguientes al decidir qué fracción o fármaco terapéutico conjugar o fusionar recombinantemente con un anticuerpo de la invención: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la condición del sujeto.

También pueden unirse los anticuerpos de la invención a soportes sólidos, que resultan particularmente útiles para inmunoensayos o para la purificación del antígeno diana. Entre dichos soportes sólidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nilón, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Composiciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que contienen uno o más anticuerpos de la invención proporcionadas en la presente memoria pueden prepararse para el almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo con el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no resultan tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Los anticuerpos de la invención proporcionados en la presente memoria también pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Los liposomas que contienen la molécula de interés se preparan mediante métodos conocidos de la técnica, tales como los indicados en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030, 1980, y patentes US nº 4.485.045 y nº 4.544.545. Se dan a conocer liposomas con un tiempo de circulación mejorado en la patente US nº 5.013.556.

Pueden generarse inmunoliposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que contiene fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido, rindiendo liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria con liposomas tal como se indica en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257:286-288, 1982, mediante una reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico (tal como la doxorubicina) se encuentra contenido opcionalmente dentro del liposoma; ver Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19):1484, 1989.

Las formulaciones, tales como las indicadas en la presente memoria, también pueden contener más de un compuesto activo según se requiera para la indicación particular bajo tratamiento. En determinadas formas de realización, las formulaciones comprenden un anticuerpo de la invención y uno o más compuestos activos con actividades complementarias que no se afectan negativamente unas a otras. Dichas moléculas se encuentran presentes convenientemente en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito deseado. Por ejemplo, puede combinarse un anticuerpo de la invención con otro u otros agentes terapéuticos. Dicha terapia combinada puede administrarse en el paciente en serie o simultáneamente, o en secuencia.

También puede atraparse un anticuerpo de la invención en una microcápsula preparada mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, una microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estéril.

También pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, estando las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT™ (microsfersas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque algunos polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan las proteínas en periodos de tiempo más cortos. En el caso de que los anticuerpos encapsulados se mantengan en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, resultando en la pérdida de actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo implicado. Por ejemplo, en el caso de que se encuentre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuros, la estabilización puede conseguirse mediante la modificación de los residuos sulfhidrilo, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones de matriz de polímero específicas.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los anticuerpos de la invención proporcionados en la presente memoria y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas resultan útiles en la prevención, tratamiento, control o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como una enfermedad intestinal inflamatoria o uno o más de los síntomas de la misma.

Entre los portadores farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en la presente memoria se incluyen cualesquiera de los portadores que es conocido por el experto en la materia que resultan adecuados para el modo de administración particular.

Además, pueden formularse los anticuerpos de la invención como único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros ingredientes activos (tal como otro u otros agentes profilácticos o terapéuticos).

Las composiciones pueden contener uno o más anticuerpos de la invención. En una forma de realización, los anticuerpos se formulan en preparaciones farmacéuticas adecuadas, tales como soluciones, suspensiones, tabletas, tabletas dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones o elixires de liberación sostenida, para la administración oral o en soluciones o suspensiones estériles para la administración parenteral, así como preparaciones de parche transdérmico e inhaladores de polvos secos. En una forma de realización, los anticuerpos indicados anteriormente se formulan en composiciones farmacéuticas utilizando técnicas y procedimientos bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4a edición, página 126, 1985).

En las composiciones, se mezclan concentraciones eficaces de uno o más anticuerpos o derivados de los mismos con un portador farmacéutico adecuado. Las concentraciones de los compuestos en las composiciones resultan eficaces para la administración de una cantidad, tras la administración, que trata, evita o alivia una enfermedad mediada por hLIGHT o síntoma de la misma.

En una forma de realización, las composiciones se formulan para la administración de dosis únicas. Para formular una composición, la fracción en peso del compuesto se disuelve, dispersa o, de otro modo, mezcla, en un portador seleccionado a una concentración eficaz, de manera que la condición tratada resulta aliviada, evitada o se alivia uno o más de los síntomas.

Se incluye un anticuerpo de la invención en el portador farmacéuticamente aceptable en una cantidad eficaz suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseables en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizando métodos rutinarios y después extrapolarse a partir de los mismos para las dosis para seres humanos.

La concentración del anticuerpo en la composición farmacéutica depende de, por ejemplo, las características físicoquímicas del anticuerpo, el programa de administración y la cantidad administrada, así como otros factores conocidos por el experto en la materia.

En una forma de realización, una dosis terapéuticamente eficaz produce una concentración sérica de anticuerpo de entre aproximadamente 0,1 ng/ml y aproximadamente 50 a 100 µg/ml. Las composiciones farmacéuticas, en

otra forma de realización, proporcionan una dosis de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 2.000 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal al día. Las formas unitarias de administración farmacéutica pueden prepararse para proporcionar entre aproximadamente 0,01 mg, 0,1 mg o 1 mg y aproximadamente 500 mg, 1.000 mg o 2.000 mg, y en una forma de realización, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 500 mg del anticuerpo y/o una combinación de otros ingredientes esenciales opcionales por cada forma unitaria de administración.

El anticuerpo puede administrarse inmediatamente, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas que deben administrarse a intervalos de tiempo. Se entiende además que la dosis exacta y la duración del tratamiento son una función de la enfermedad bajo tratamiento y que pueden determinarse empíricamente utilizando protocolos de ensayo conocidos o mediante extrapolación a partir de datos experimentales *in vivo* o *in vitro*. Debe indicarse que las concentraciones y valores de dosis también pueden variar con la gravedad de la condición que debe aliviarse. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, pueden adaptarse regímenes de administración específicos durante el tiempo según las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentraciones fijados en la presente memoria son únicamente ejemplificativos y no pretenden ser limitativos del alcance o práctica de las composiciones reivindicadas.

Tras la mezcla o la adición del anticuerpo, la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo pretendido de administración y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz resulta suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, trastorno o condición tratado y puede determinarse empíricamente.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración en seres humanos y animales en formas de administración unitaria, tales como tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite-en-agua que contiene cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. El anticuerpo se formula y se administra, en una forma de realización, en formas de dosis única o en formas de múltiples dosis. Las formas de dosis unitaria tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para sujetos humanos y animales y empaquetadas individualmente tal como es conocido de la técnica. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada del anticuerpo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, asociado con el portador, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Entre los ejemplos de formas de dosis unitaria se incluyen ampollas y jeringas y tabletas o cápsulas empaquetadas individualmente. Las formas de dosis unitaria pueden administrarse en fracciones o múltiples de las mismas. Una forma de dosis múltiple es una pluralidad de formas de dosis única idénticas empaquetadas en un único envase que debe administrarse en forma de dosis unitaria segregada. Entre los ejemplos de formas de múltiples dosis se incluyen viales, botellas de tabletas o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, la forma de dosis múltiples es un múltiple de las dosis unitarias que no están segregadas en el envase.

En formas de realización preferidas, uno o más anticuerpos anti-HLIGHT de la invención se encuentran en una formulación farmacéutica líquida. Las composiciones farmacéuticamente administrables líquidas pueden prepararse, por ejemplo, mediante disolución, dispersión o, de otro modo, mezcla con un compuesto activo tal como se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol y similares, para formar de esta manera una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que debe administrarse puede contener además cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizadores, agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina sodio, oleato de trietanolamina y otros agentes similares.

Se conocen métodos de preparación de dichas formas de administración o resultarán evidentes para el experto en la materia; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

Pueden prepararse formas o composiciones de administración que contienen anticuerpo en el intervalo de 0,005% a 100%, enrasando con portador no tóxico. Los métodos para la preparación de dichas composiciones son conocidos por el experto en la materia.

Las formas de administración farmacéutica oral son sólidas, gel o líquidas. Las formas de administración sólidas son tabletas, cápsulas, gránulos y polvos en masa. Entre los tipos de tabletas orales se incluyen pastillas masticables comprimidas y tabletas que pueden presentar un recubrimiento entérico, un recubrimiento de azúcar o un recubrimiento de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina dura o blanda, mientras que los gránulos y polvos pueden proporcionarse en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por el experto en la materia.

En determinadas formas de realización, las formulaciones son formas de administración sólidas. En

determinadas formas de realización, las formulaciones son cápsulas o tabletas. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante, un lubricante, un diluyente, un glidante, un agente desintegrante, un agente colorante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un agente humectante, un recubrimiento emético y un recubrimiento de película. Entre los ejemplos de ligantes se incluyen celulosa microcristalina, goma tragacanto, solución de glucosa, mucílago de acacia, solución de gelatina, melaza, polivinilpirrolidona, povidona, crospovidona, sacarosa y pasta de almidón. Entre los lubricantes se incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, licopodio y ácido esteárico. Entre los diluyentes se incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Entre los glidantes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, dióxido de silicio coloidal. Entre los agentes desintegrantes se incluyen croscarmelosa sódica, glicolato de almidón sódico, ácido alginico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Entre los agentes colorantes se incluyen, por ejemplo, cualquiera de los pigmentos FD y C solubles en agua certificados y autorizados, mezclas de los mismos, y pigmentos FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Entre los agentes edulcorantes se incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales, tales como sacarina, y cualquier número de sabores secados por pulverización. Entre los agentes saborizantes se incluyen sabores naturales extraídos de plantas, tales como frutos y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tales como, aunque sin limitación, menta y salicilato de metilo. Entre los agentes humectantes se incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y laural-éter de polioxietileno y ftalatos de acetato de celulosa. Entre los recubrimientos de película se incluyen hidroxietilcelulosas, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol 4000 y ftalato de acetato de celulosa.

Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en una composición que los protege del medio ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el compuesto activo en el intestino. La composición también puede formularse en combinación con un antácido u otro ingrediente similar.

En el caso de que la forma de dosis unitaria sea una cápsula, puede contener, además de material del tipo anteriormente indicado, un portador líquido, tal como un aceite graso. Además, las formas de dosis unitaria pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la dosis unitaria, por ejemplo recubrimiento de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también pueden administrarse como componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, polvos, goma masticable o similar. Un jarabe puede contener, además de los compuestos activos, sacarosa a modo de agente edulcorante y determinados conservantes, pigmentos y colorantes y sabores.

El anticuerpo también puede mezclarse con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada, tal como antácidos, bloqueantes de H₂ y diuréticos. El ingrediente activo es un anticuerpo o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se indica en la presente memoria. Pueden incluirse concentraciones más altas, de hasta aproximadamente 98% en peso del ingrediente activo.

En todas las formas de realización, las tabletas y formulaciones de cápsula pueden recubrirse tal como es conocido por el experto en la materia con el fin de modificar o sostener la disolución del ingrediente activo. De esta manera, por ejemplo, pueden recubrirse con un recubrimiento entéricamente digerible convencional, tal como salicilato de fenilo, ceras y ftalato de acetato de celulosa.

En formas de realización preferidas, las formulaciones son formas de administración líquidas. Entre las formas de administración oral líquidas se incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Entre las soluciones acuosas se incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son de aceite-en-agua o de agua-en-aceite.

Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas edulcoradas transparentes. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en los elixires se incluyen solventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el que un líquido se dispersa en forma de pequeños glóbulos en la totalidad de otro líquido. Los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en las emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones utilizando agentes de suspensión y conservantes farmacéuticamente aceptables. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los gránulos no efervescentes, que deben reconstituirse en una forma de administración oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los gránulos efervescentes, que deben reconstituirse en una forma de administración oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y saborizantes se utilizan en la totalidad de las formas de administración anteriormente indicadas.

Entre los solventes se incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen glicerina, metil- y propil-parabeno, ácido benzoico, benzoato sódico y alcohol. Entre los ejemplos de

líquidos no acuosos utilizados en las emulsiones se incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Entre los ejemplos de agentes emulsionantes se incluyen gelatina, acacia, tragacanto, bentonita y surfactantes, tales como monooleato de polioxietilén sorbitán. Entre los agentes de suspensión se incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y acacia. Entre los agentes edulcorantes se incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales, tales como sacarina. Entre los agentes humectantes se incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Entre los ácidos orgánicos se incluyen ácido cítrico y ácido tartárico. Entre las fuentes de dióxido de carbono se incluyen bicarbonato sódico y carbonato sódico. Entre los agentes colorantes se incluyen cualquiera de los pigmentos FD y C solubles en agua certificados y autorizados, y mezclas de los mismos. Entre los agentes saborizantes se incluyen sabores naturales extraídos de plantas, tales como frutos, y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor agradable.

Para una forma de administración sólida, la solución o suspensión, en por ejemplo carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, es, en una forma de realización, encapsulada en una cápsula de gelatina. Dichas soluciones, y la preparación y encapsulado de las mismas, se dan a conocer en las patentes US nº 4.328.245, nº 4.409.239 y nº 4.410.545. Para una forma de administración líquida, la solución, por ejemplo, en polietilenglicol, puede diluirse con una cantidad suficiente de un portador líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, para una medición sencilla para la administración.

Alternativamente, las formulaciones orales líquidas o semisólidas pueden prepararse mediante la disolución o dispersión del compuesto activo o sal en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (por ejemplo, carbonato de propileno) y otros portadores similares, y el encapsulado de dichas soluciones o suspensiones en cubiertas de cápsula de gelatina dura o blanda. Entre otras formulaciones útiles se incluyen las indicadas en las patentes US nº RE28.819 y nº 4.358.603. Brevemente, entre dichas formulaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las que contienen un compuesto proporcionado en la presente memoria, un mono- o poli-alquilenglicol dialquilado, incluyendo, aunque sin limitación, 1,2-dimetoximetano, diglima, triglima, tetraglima, polietilenglicol-350-dimetil éter, en el que 350, 550 y 750 se refieren al peso molecular medio aproximado del polietilenglicol, y uno o más antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxycoumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y ésteres del mismo, y ditiocarbamatos.

Entre otras formulaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, soluciones alcohólicas acuosas, incluyendo un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes utilizados en dichas formulaciones son cualesquiera solventes miscibles en agua farmacéuticamente aceptables que presentan uno o más grupos hidroxilo, incluyendo, aunque sin limitación, propilenglicol y etanol. Entre los acetales se incluyen, aunque sin limitación, acetales de di(alquilo inferior) de aldehídos de alquilo inferior, tales como dietil acetal de acetaldehído.

La administración parenteral, en una forma de realización, se caracteriza por la inyección, subcutánea, intramuscular o intravenosa, también contemplada en la presente memoria. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido previamente a la inyección, o como emulsiones. Los inyectables, soluciones y emulsiones contienen además uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que deben administrarse pueden contener además cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, intensificadores de la solubilidad y otros agentes similares, tales como, por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantiene un nivel constante de dosis (ver, por ejemplo, la patente US nº 3.710.795) también se encuentra contemplada en la presente memoria. Brevemente, un compuesto proporcionado en la presente memoria se dispersa en una matriz interna sólida, por ejemplo, polimetilmetacrilato, polibutylmetacrilato, cloruro de polivinilo plastificado o no plastificado, nilón plastificado, tereftalato de polietileno plastificado, caucho natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrofílicos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, alcohol polivinílico entrecruzado y acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado y entrecruzado, que se encuentra circundado por una membrana polimérica externa, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, cauchos de silicona, polidimetilsiloxanos, caucho neopreno, polietileno clorado, cloruro de polivinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, yonómero tereftalato de polietileno, cauchos de caucho de butilo-epiclorohidrina, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en líquidos corporales. El anticuerpo se difunde a través de la membrana polimérica externa en una etapa de control de la tasa de liberación. La cantidad de anticuerpo contenida en dichas composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica de las mismas, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Entre las preparaciones para la administración parenteral se incluyen soluciones estériles listas para la inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente inmediatamente antes de la utilización, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para la inyección, productos insolubles secos estériles listos para combinar con un vehículo inmediatamente antes de la utilización y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

En caso de administrarse por vía intravenosa, entre los portadores adecuados se incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agente espesantes y solubilizadores, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales se incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Entre los ejemplos de vehículos acuosos se incluyen cloruro sódico para inyección, solución de Ringer para inyección, solución isotónica de dextrosa para inyección, agua estéril para inyección, dextrosa y solución de Ringer lactato para inyección. Entre los vehículos parenterales no acuosos se incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Pueden añadirse agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales empaquetadas en envases multidosis, incluyendo fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Entre los agentes isotónicos se incluyen cloruro sódico y dextrosa. Entre los tampones se incluyen fosfato y citrato. Entre los antioxidantes se incluyen bisulfato sódico. Entre los anestésicos locales se incluyen hidrocloreuro de procaína. Entre los agentes de suspensión y dispersantes se incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y olivinilpirrolidona. Entre los agentes emulsionantes se incluyen polisorbato 80 (TWEEN® 80). Entre los agentes secuestrantes o quelantes de iones metálicos se incluye EDTA. Entre los portadores farmacéuticos se incluyen además alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua, e hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para el ajuste del pH.

La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de manera que la inyección proporcione una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal tal como es conocido de la técnica.

Las preparaciones parenterales de dosis unitaria pueden envasarse en una ampolla, vial o jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para la administración parenteral pueden ser estériles, tal como es conocido y es puesto en práctica en la técnica.

A título ilustrativo, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene un compuesto activo es un modo de administración eficaz. Otra forma de realización es una solución o suspensión acuosa o aceitosa estéril que contiene un material activo inyectado según resulte necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

Los inyectables han sido diseñados para la administración local y sistémica. En una forma de realización, se formula una dosis terapéuticamente eficaz para que contenga una concentración de entre por lo menos aproximadamente 0,1% p/p y aproximadamente 90% p/p o superior, en determinadas formas de realización más de 1% p/p del compuesto activo en el tejido o tejidos tratados.

El anticuerpo puede suspenderse en forma micronizada o en otra forma adecuada. La forma de la mezcla resultante depende de varios factores, incluyendo el modo de administración deseado y la solubilidad del compuesto en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz resulta suficiente para aliviar los síntomas de la condición y puede determinarse empíricamente.

En otras formas de realización, las formulaciones farmacéuticas son polvos liofilizados, los cuales pueden reconstituirse para la administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También pueden reconstituirse y formularse en forma de sólidos o geles.

Los polvos liofilizados se preparan mediante la disolución de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un solvente adecuado. En algunas formas de realización los polvos liofilizados son estériles. El solvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico de los polvos o solución reconstituida, preparada a partir de los polvos. Entre los excipientes que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente puede contener además un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón similar conocido por el experto en la materia, en una forma de realización, aproximadamente pH neutro. La filtración a esterilidad a continuación

de la solución, seguido de liofilización bajo condiciones estándares conocidas por el experto en la materia proporciona la formulación deseada. En una forma de realización, la solución resultante se divide en viales para la liofilización. Cada vial contiene un única dosis o múltiples dosis del compuesto. Los polvos liofilizados pueden almacenarse bajo condiciones apropiadas, tales como una temperatura de entre aproximadamente 4°C y la temperatura ambiente.

La reconstitución de dichos polvos liofilizados con agua para inyección proporciona una formulación para la utilización en la administración parenteral. Para la reconstitución, los polvos liofilizados se añaden a agua estéril o a otro portador adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad puede determinarse empíricamente.

Se preparan mezclas tópicas tal como se ha indicado para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar y puede formularse como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, sprays, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualesquiera otras formulaciones adecuadas para la administración tópica.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse como aerosoles para la aplicación tópica, tal como mediante inhalación (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.044.126, nº 4.414.209 y nº 4.364.923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular asma). Estas formulaciones para la administración en el tracto respiratorio pueden presentar la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o de polvos microfinos para insuflado, solos o en combinación con un portador inerte, tal como lactosa. En este caso, las partículas de la formulación presentarán, en una forma de realización, diámetros inferiores a 50 micrómetros, en una forma de realización menos de 10 micrómetros.

Los compuestos pueden formularse para la aplicación local o tópica, tal como para la aplicación tópica en la piel y membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y para la aplicación en el ojo o para la aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se encuentra contemplada para la administración transdérmica y también para la administración en los ojos o mucosas, o para terapias mediante inhalación. También pueden administrarse soluciones nasales del compuesto activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Dichas soluciones, en particular las destinadas para la utilización oftálmica, pueden formularse en forma de soluciones isotónicas al 0,01%-10%, con pH de aproximadamente 5 a 7, con sales apropiadas.

También se encuentran contempladas en la presente memoria otras vías de administración, tales como parches transdérmicos, incluyendo dispositivos yontoforéticos y electroforéticos, y la administración rectal.

Los parches transdérmicos, incluyendo los dispositivos yontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, dichos parches se dan a conocer en las patentes US nº 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6.024.975, 6.010.715, 5.985.317, 5.983.134, 5.948.433 y 5.860.957.

Por ejemplo, las formas de administración farmacéutica para la administración rectal son los supositorios rectales, las cápsulas y las tablas para el efecto sistémico. Los supositorios rectales se utilizan en la presente memoria en referencia a cuerpos sólidos para la inserción en el recto que se funden o ablandan a temperatura corporal, liberando uno o más ingredientes farmacológica o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes que elevan el punto de fusión. Entre los ejemplos de bases se incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, Carbowax (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y tri-glicéridos de ácidos grasos. Pueden utilizarse combinaciones de las diversas bases. Entre los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios se incluyen esperma de ballena y cera. Pueden prepararse supositorios rectales mediante el método de compresión o mediante moldeo. El peso de un supositorio rectal, en una forma de realización, es de aproximadamente 2 a 3 g.

Las tabletas y cápsulas para la administración rectal pueden prepararse utilizando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos que para las formulaciones para la administración oral.

Los anticuerpos y otras composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse para actuar con diana en un tejido particular, receptor u otra área del cuerpo del sujeto que debe tratarse. Muchos de dichos métodos de transporte dirigido son bien conocidos por el experto en la materia. La totalidad de dichos métodos de transporte dirigido se encuentran contemplados en la presente memoria para la utilización en las composiciones de la invención. Para ejemplos no limitativos de métodos de transporte dirigido, ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-HLIGHT de la invención se transportan dirigidamente (o

de otro modo, se administran) en el colon, tal como en un paciente que presenta o está en riesgo de presentar una EII.

En una forma de realización, las suspensiones liposómicas, incluyendo los liposomas dirigidos a tejido, tales como liposomas con diana en tumores, también pueden resultar adecuados como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones de liposomas tal como se indica en la patente US nº 4.522.811. Brevemente, pueden formarse liposomas, tales como vesículas multilamelares (VML) mediante secado de fosfatidilcolina de huevo y fosfatidilserina cerebral (proporción molar de 7:3) en el interior de un matraz. Se añade una solución de un compuesto proporcionado en la presente memoria en solución salina tamponada con fosfato que no presenta cationes divalentes (PBS) y se agita el matraz hasta dispersar la película lipídica. Las vesículas resultantes se lavan para eliminar el compuesto no encapsulado, se peletizan mediante centrifugación y después se resuspenden en PBS.

Métodos de administración y dosis

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT (o síntoma de la misma).

En determinadas formas de realización, en la presente memoria se proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como las EII (por ejemplo, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn) o un síntoma de las mismas. Los síntomas de la EII pueden ir de leves a moderadas y generalmente dependen de la parte del tracto intestinal afectada. Entre los síntomas ejemplificativos de las EII se incluyen calambres y dolor abdominales, diarrea sanguinolenta, urgencia severa de movimiento intestinal, fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, anemia, fatiga y/o úlceras en la parte inferior de las piernas, tobillos, pantorrillas, muslos y brazos. Entre las complicaciones intestinales ejemplificativas de las EII se incluyen sangrado abundante de úlceras, perforación o ruptura del intestino, estenosis y obstrucción, fistulas (paso anómalo) y enfermedad perianal, megacolon tóxico (por ejemplo, dilatación no obstructiva aguda del colon) y/o tumores malignos (por ejemplo, cáncer del colon o del intestino delgado). Entre las complicaciones extraintestinales ejemplificativas de las EII se incluyen artritis, condiciones de la piel, inflamación de los ojos, trastornos renales y hepáticos y/o pérdida ósea. Puede prevenirse, controlarse, tratarse y/o aliviarse cualquier combinación de dichos síntomas utilizando las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

En determinadas formas de realización, en la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención para la utilización en la invención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como la EICH, o un síntoma de la misma. La EICH generalmente se produce tras un trasplante de médula ósea alogénico o no relacionado compatible (TNRC).

En algunas formas de realización, la EICH es EICH aguda. Los síntomas de la EICH aguda pueden producirse con rapidez y ser leves o graves. En determinados casos, la EICH aguda se desarrolla dentro de aproximadamente los 3 primeros meses después del trasplante, tal como durante el periodo en que los recuentos sanguíneos se recuperan después del trasplante. En determinados casos, la EICH aguda afecta a la piel, tracto gastrointestinal (GI) y/o hígado. Por ejemplo, en algunos pacientes, la EICH de la piel aguda se inicia con una erupción, por ejemplo, en las palmas de las manos del paciente, plantas de los pies u hombros. Sin embargo, la erupción puede generalizarse y puede producir prurito y ser dolorosa y/o generar ampollas y exfoliarse. La EICH hepática aguda puede afectar a las funciones normales del hígado, tal como a los enzimas hepáticos, y puede a su vez, provocar ictericia. La EICH hepática aguda también puede provocar que el abdomen del paciente se hinche y duela en caso de agrandamiento del hígado. Finalmente, los síntomas de la EICH intestinal aguda (o EICH del sistema digestivo) pueden incluir diarrea, moco o sangre en las heces, calambres o dolores abdominales, indigestión, náusea y/o pérdida del apetito. Otros síntomas generales de la EICH aguda pueden incluir anemia, fiebre baja y/o mayor tendencia a infecciones. Cualquier combinación de dichos síntomas de la EICH aguda puede prevenirse, controlarse, tratarse y/o aliviarse utilizando las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

En otras formas de realización, la EICH es EICH crónica. La EICH crónica puede producirse entre aproximadamente tres meses y aproximadamente un año o más tarde después del trasplante. La EICH crónica puede ser leve o grave, y generalmente incluye síntomas similares a los de la EICH aguda. La EICH crónica puede afectar a la piel y al sistema digestivo, incluyendo el hígado, aunque también puede afectar a otros órganos y al sistema inmunológico (por ejemplo, haciendo que el paciente presente una mayor tendencia a infecciones) y/o a los tejidos conectivos. Entre los síntomas de la EICH crónica de la piel se incluyen erupciones, piel seca, piel tirante, prurito, oscurecimiento de la piel, engrosamiento de la piel y/o puede afectar al pelo (por ejemplo, pérdida de peso, enanecimiento, etc.) o uñas (por ejemplo, uñas duras o frágiles). La EICH intestinal crónica puede afectar al sistema digestivo, boca, esófago, revestimiento del estómago o revestimiento del intestino, y entre los síntomas pueden incluirse diarrea, boca seca o ulcerada, deglución dolorosa, baja absorción

de los nutrientes por el estómago, distensión, calambres en el estómago, etc. La EICH hepática crónica puede provocar daños y cicatrices en el hígado (cirrosis). La EICH crónica de los ojos puede afectar a las glándulas lacrimales, causando que los ojos se sequen, quemen o resulten dolorosos o toleren mal la luz brillante. La EICH pulmonar crónica puede provocar falta de aliento, sibilancias, tos persistente y/o mayor tendencia a infecciones torácicas. La EICH crónica afecta a los tendones (por ejemplo, mediante inflamación) que conectan los músculos a los huesos, provocan dificultad para estirar o doblar brazos y piernas. Cualquier combinación de dichos síntomas de EICH crónica puede prevenirse, controlarse, tratarse y/o aliviarse utilizando las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria.

En una forma de realización específica, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23. En una forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización específica, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo E1, E13, E63, F19 y/o F23. En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden uno o más dominios VH que presentan una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VH ilustrados en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en el tratamiento, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VH ilustrada en la SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23 (es decir, CDR1 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VH ilustradas en la SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24 (es decir, las CDR2 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En una forma de realización preferente, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VH ilustrada en SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25 (es decir, las CDR3 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden uno o más dominios VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VL ilustrados en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VL ilustradas en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VL ilustradas en SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39 (es decir, las CDR2 de VL de la VL ilustrada en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En una forma de realización preferente, una composición para la utilización, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio

de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden uno o más dominios VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las dominios VH ilustrados en SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y uno o más dominios VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VL ilustrados en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10 o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VH ilustradas en SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23 (es decir, las CDR1 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR1 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VL ilustrada en la SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95 o 38 (es decir, CDR1 de VL de VL representada en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E3, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VH ilustradas en SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23 (es decir, las CDR1 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR2 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VL de la VL ilustrada en SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39 (es decir, las CDR2 de VL de la VL ilustrada en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VH ilustradas en la SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23 (es decir, las CDR1 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL ilustradas en SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40 (es decir, las CDR3 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VH ilustradas en la SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24 (es decir, las CDR2 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR1 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VL ilustradas en la SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95 o 38 (es decir, las CDR1 de VL de la VL ilustrada en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VH ilustradas en la SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24 (es decir, las CDR2 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR2 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VL ilustradas en la SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39 (es decir, las CDR2 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 86, 2, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VH ilustradas en la SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24 (es decir, las CDR2 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL ilustradas en la SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40 (es decir, las CDR3 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VH ilustradas en la SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25 (es decir, las CDR3 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR1 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR1 de VL ilustradas en la SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95 o 38 (es decir, las CDR1 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VH ilustradas en la SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25 (es decir, las CDR3 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR2 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR2 de VL ilustradas en la SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39 (es decir, las CDR2 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VH ilustradas en la SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25 (es decir, las CDR3 de VH de la VH ilustrada en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23) y una o más CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR3 de VL ilustradas en la SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40 (es decir, las CDR3 de VL de la VL ilustrada en la SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, respectivamente) o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23).

En una forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un dominio VH con la secuencia de aminoácidos del dominio VH ilustrado en cualquiera de las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5 y/o un dominio VL con la secuencia de aminoácidos del dominio VL ilustrado en cualquiera de las SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91 o 10.

En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (a) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 1 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 82, 6 o 83, (b) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 2 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 7, (c) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 3 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 8, (d) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 4 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 90, 9, 91 o 92, o (e) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 5 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 10. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio VH con la secuencia de aminoácidos del dominio VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o un dominio VL con la secuencia de aminoácidos del dominio VL de un anticuerpo con el nº de acceso de la ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (a) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1) y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1), (b) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13) y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13), (c) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63) y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63), (d) un dominio VH con la

secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19) y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (e) un dominio VH con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23) y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en las SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR2 de VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5. En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH y/o una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH seleccionado independientemente de entre una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y CDR3 de VH tal como se ilustra en cualquiera de las regiones VH ilustradas en la SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5.

La presente exposición proporciona además una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una o más CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR de VL (es decir, CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL) de E1, E13, E63, F19 y/o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma con el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (1) un dominio VH que presenta: (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 11, 12 y/o 13, respectivamente; (b) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 14, 15 y/o 16, respectivamente; (c) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 17, 18 y/o 19, respectivamente; (d) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 20, 21 y/o 22, respectivamente; o (e) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 23, 24 y/o 24, respectivamente, y/o (2) un dominio VL que presenta: (a) una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 84, 26, o 85, una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de la SEC ID nº 86, 27 o 87, y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de la SEC ID nº 88, 28 o 89; (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 29, 30 y/o 31, respectivamente; (c) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 32, 33 y/o 34, respectivamente; (d) una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 93, 35, 94 o 95; una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de las SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, o (e) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEC ID nº 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (1) un dominio VH que presenta: (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1); (b) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13); (c) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63); (d) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3

de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (e) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23), y/o (2) un dominio VL que presenta: (a) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1); (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13); (c) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63); (d) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (e) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo con el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (1) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 11, 12 y/o 13, respectivamente, y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 84, 26 o 85, una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 86, 27 o 87, y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 88, 28 o 89; (2) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 14, 15 y/o 16, respectivamente, y (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 29, 30 y/o 31, respectivamente, (3) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 17, 18 y/o 19, respectivamente, y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 32, 33 y/o 34, respectivamente, (4) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 20, 21 y/o 22, respectivamente, y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 93, 35, 94 o 95, una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en cualquiera de SEC ID nº 96, 36, 97 o 98, o (5) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 23, 24 y/o 24, respectivamente, y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos ilustrada en SEC ID nº 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (1) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1), y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729 (E1); (2) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13) y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7842 (E13); (3) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63) y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7818 (E63); (4) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19) y una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7819 (F19), o (5) (a) un dominio VH que presenta una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH de un anticuerpo que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23) y (b) un dominio VL que presenta una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL de un anticuerpo que

presenta el nº de acceso ATCC PTA-7728 (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 94, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En otra forma de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID Nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). En determinadas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VL y/o una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL seleccionadas independientemente de entre CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL tal como se ilustra en cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID Nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

En algunas formas de realización, una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende: (1) un dominio o cadena VH que presenta uno o más de entre: (a) una CDR1 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), o (c) una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de una CDR3 DE VH de cualquiera de las regiones VH ilustradas en SEC ID nº 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), y/o (2) un dominio o cadena VL que presenta uno o más de entre: (a) una CDR1 de VL con la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), y/o (c) una CDR3 de VL con la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de cualquiera de las regiones VL ilustradas en SEC ID nº 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92 o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

La presente exposición proporciona además una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una o más CDR de VH y una o más CDR de VL listadas en la Tabla I. En particular, la exposición proporciona una composición para la utilización en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23) y una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20 o 23) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 DE VL (SEC

ID nº 96, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR1 de VH, una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 6, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 DE VH (SEC ID Nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 DE VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 DE VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 DE VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR2 de VH (SEC ID nº 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), una CDR1 de VH (SEC ID nº 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID nº 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 DE VL (SEC ID nº 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VL (SEC ID nº 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98 o 39) y una CDR3 de VL (SEC ID nº 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40), o cualquier combinación de los mismos de las CDR de VH (SEC ID nº 11-25) y CDR de VL (SEC ID nº 26-40) listados en la Tabla I. Las CDR de VH y CDR de VL correspondientes de nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19, o F23), también pueden utilizarse en cualquiera de las combinaciones listadas anteriormente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Tal como se comenta en mayor detalle en otros sitios de la presente memoria, puede utilizarse una composición de la invención sola o en combinación con otros compuestos o composiciones. Además, los anticuerpos pueden además fusionarse recombinantemente con un polipéptido heterólogo en el extremo N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente con moléculas útiles como marcajes en ensayos de detección, y moléculas efectoras tales como polipéptido

heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 92/08495, nº WO/91/14438, nº WO 89/12624 y las patentes US nº 5.314.995 y EP nº 396.387.

En algunas formas de realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DcR3 en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), que comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble). En una forma de realización, hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. En algunas formas de realización, una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, también se encuentra reducida o inhibida en el sujeto.

En determinadas formas de realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en un sujeto (por ejemplo un sujeto humano), que comprende administrar en el sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo hLIGHT expresado sobre la superficie celular), en el que la actividad biológica de hLIGHT resulta reducida o inhibida por el anticuerpo. En algunas formas de realización, hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L.

En otras formas de realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, RLTβ y/o DcR3 en una célula que presenta hLIGHT expresado sobre la superficie celular, poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble), tal como un polipéptido hLIGHT, un fragmento de polipéptido hLIGHT o un epítipo de hLIGHT. En determinadas formas de realización, hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. En algunas formas de realización, una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, también se encuentra reducida o inhibida en la célula.

En determinadas formas de realización, en la presente memoria se proporcionan métodos para reducir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que presenta un receptor de hLIGHT expresado sobre la superficie celular (tal como HVEM, RLTβ y/o DcR3), poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido hLIGHT (por ejemplo un hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble), en el que la actividad biológica de hLIGHT se encuentra reducida o inhibida por el anticuerpo. En algunas formas de realización, hLIGHT es una variante SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para, por ejemplo, purificar, detectar y reconocer antígenos hLIGHT, en métodos diagnósticos y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos modificados encuentran utilidad en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente los niveles de hLIGHT en muestras biológicas. Ver, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed., 1988).

La invención proporciona además métodos de prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT mediante la administración en un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención. En un aspecto, el anticuerpo ha sido purificado sustancialmente (es decir, se encuentra sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En formas de realización preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano, tal como un anticuerpo antagonista monoclonal totalmente humano. El sujeto en el que se administra una terapia preferentemente es un mamífero, tal como no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono *Cynomolgus*, o un ser humano). En una forma de realización preferente, el sujeto es un ser humano. En otra forma de realización preferente, el sujeto es un niño humano o un niño humano de nacimiento prematuro. En otra forma de realización, el sujeto es un ser humano con una enfermedad mediada por hLIGHT.

Se conocen diversos sistemas de administración, que pueden utilizarse para administrar un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la invención), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el encapsulado en liposomas, las micropartículas, las microcápsulas, las células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, la endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987), la construcción de ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector, etc. Entre los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la invención, o composición farmacéutica, se incluyen, aunque sin limitación, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosal (por ejemplo, las vías intranasal y oral). En una forma de realización específica, se administra por vía intranasal, intramuscular, intravenosa o subcutánea un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención), o una composición farmacéutica. Los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones, pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa intranasal, la mucosa rectal e

intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede utilizarse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante la utilización de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.019.968, nº 5.985.320, nº 5.985.309, nº 5.934.272, nº 5.874.064, nº 5.855.913, nº 5.290.540 y nº 4.880.078, y las publicaciones de patente PCT nº WO 92/19244, nº WO 97/32572, nº WO 97/44013, nº WO 98/31346 y WO nº 99/66903.

En una forma de realización específica, puede resultar deseable administrar un agente profiláctico o terapéutico, o una composición farmacéutica de la invención localmente en el área que requiere tratamiento. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, y no a título ilustrativo, la infusión local, mediante administración tópica (por ejemplo, mediante spray intranasal), mediante inyección o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferentemente, al administrarlo un anticuerpo de la invención, debe procurarse utilizar materiales a los que no se adsorban los anticuerpos.

En otra forma de realización, un agente profiláctico o terapéutico, o una composición de la invención, puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990; Treat *et al.*, en: *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, López-Berestein y Fidler (editores), Liss, New York, páginas 353 a 365, 1989; López-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; ver generalmente *ibid.*).

En otra forma de realización, un agente profiláctico o terapéutico, o una composición de la invención, puede administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una forma de realización, puede utilizarse una bomba para conseguir una liberación controlada o sostenida (ver Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507, 1980; Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989). En otra forma de realización, pueden utilizarse materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada o sostenida de un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo anticuerpos de la invención) o una composición de la invención (ver, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (editores), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (editores), Wiley, New York, 1984; Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983; ver también Levy *et al.*, *Science* 228:190, 1985; During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howear *et al.*, *J. Neurosurg.* 7 1:105, 1989); patentes US nº 5.679.377, nº 5.916.597, nº 5.912.015, nº 5.989.463 y nº 5.128.326, publicaciones de patente PCT nº WO 99/15154 y nº WO 99/20253. Entre los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida se incluyen, aunque sin limitación, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-acetato de covinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una forma de realización preferente, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, se encuentra libre de impurezas lixiviables, es estable durante el almacenamiento, es estéril y es biodegradable. En todavía otra forma de realización, un sistema de liberación controlada o sostenida puede situarse próximo a la diana terapéutica, es decir, los conductos nasales o pulmones, requiriendo de esta manera únicamente una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en: *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, páginas 115 a 138, 1984). Los sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533, 1990). Puede utilizarse cualquier técnica conocida por el experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. Ver, por ejemplo, la patente US nº 4.526.938, la publicación de patente PCT nº WO 91/05548, la publicación de patente PCT nº WO 96/20698; Ning *et al.*, "Intratumoral Radioimmunotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song *et al.*, *Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsiones*, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek *et al.*, *Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application*, *Pro. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997, y Lam *et al.*, *Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997.

En una forma de realización específica, en la que la composición de la invención es un ácido nucleico codificante de un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la invención), el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para estimular la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, mediante la construcción del mismo como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos y la administración de éste de manera que se vuelva intracelular, por ejemplo mediante la utilización de un vector retroviral (ver la patente US nº 4.980.286) o mediante la inyección directa, o mediante la utilización del bombardeo de micropartículas (por ejemplo una pistola génica; Biolistic, Dupont) o el recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante la administración del mismo en enlace a un péptido de tipo homeobox que es conocido que entra en el núcleo (ver, por ejemplo, Joliot *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868, 1991), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para la expresión mediante recombinación homóloga.

En una forma de realización específica, una composición de la invención comprende uno, dos o más anticuerpos de la invención. En otra forma de realización, una composición de la invención comprende uno, dos o más

anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o terapéutico diferente de un anticuerpo de la invención. Preferentemente, es conocido que los agentes resultan útiles o han sido utilizados o se utilizan actualmente para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT. Además de los agentes profilácticos o terapéuticos, las composiciones de la invención también pueden comprender un portador.

Entre las composiciones de la invención se incluyen composiciones de fármaco en masa que resultan útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones que resultan adecuadas para la administración en un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosis unitaria. En una forma de realización preferente, una composición de la invención es una composición farmacéutica. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos (por ejemplo, un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico) y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se formulan para que resulten adecuadas para la vía de administración en el sujeto.

En una forma de realización específica, el término "portador" se refiere a un diluyente adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agente es un portador preferente en el caso de que la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden utilizarse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol a modo de portadores líquidos, en particular para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden presentar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir portadores estándares, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990. Dichas composiciones contienen una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del anticuerpo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de manera que proporcione la forma para la administración correcta en el paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

En una forma de realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa en el ser humano. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, la composición puede incluir además un agente solubilizador y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Sin embargo, dichas composiciones pueden administrarse por una vía diferente de la intravenosa.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran separadamente o se mezclan entre sí en una forma de dosis unitaria, por ejemplo, en forma de unos polvos liofilizados secos o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. En el caso de que la composición se administre mediante infusión, puede dispersarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. En el caso de que la composición se administre mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para la inyección o solución salina de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La invención proporciona además que un anticuerpo de la invención se empaquete en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de anticuerpo. En una forma de realización, el anticuerpo se suministra en forma de unos polvos liofilizados esterilizados o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para la administración en el sujeto. Preferentemente, el anticuerpo se suministra en forma de unos polvos liofilizados estériles secos en un envase herméticamente sellado a una dosis unitaria de por lo menos 0,1 mg, de por lo menos 0,5 mg, de por lo menos 1 mg, de por lo menos 2 mg o de por lo menos 3 mg, y más preferentemente de por lo menos 5 mg, de por lo menos 10 mg, de por lo menos 15 mg, de por lo menos 25 mg, de por lo menos 30 mg, de por lo menos 35 mg, de por lo menos 45 mg, de por lo menos 50 mg, de por lo menos 60 mg, de por lo menos 75 mg, de por lo menos 80 mg, de por lo menos 85 mg, de por lo menos 90 mg, de por lo menos 95 mg o de por lo menos 100 mg. El anticuerpo liofilizado puede almacenarse entre 2°C y 8°C en su envase original y el anticuerpo puede administrarse dentro de las 12 horas, preferentemente las 6 horas, las 5 horas, las 3 horas o la 1 hora posterior a la reconstitución. En una forma de realización alternativa, un anticuerpo se suministra en forma líquida en un envase herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo. Preferentemente, la forma líquida del anticuerpo se suministra en un envase herméticamente sellado que contiene por lo menos 0,1 mg/ml, por lo menos 0,5 mg/ml o por lo menos 1 mg/ml, y más preferentemente por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 15 mg/ml, por lo menos 25

mg/ml, por lo menos 30 mg/ml, por lo menos 40 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 60 mg/ml, por lo menos 70 mg/ml, por lo menos 80 mg/ml, por lo menos 90 mg/ml o por lo menos 100 mg/ml.

- Las composiciones de la invención pueden formularse en formas neutras o salinas. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las formadas con aniones, tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con cationes, tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina, etc.
- La cantidad de un agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo de la invención), o composición de la invención, que resultará eficaz en la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT podrá determinarse mediante técnicas clínicas estándares.
- De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una dosis de un anticuerpo o de una composición que resulta en un título sérico de entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 450 µg/ml, y en algunas formas de realización de por lo menos 0,1 µg/ml, de por lo menos 0,2 µg/ml, de por lo menos 0,4 µg/ml, de por lo menos 0,5 µg/ml, de por lo menos 0,6 µg/ml, de por lo menos 0,6 µg/ml, de por lo menos 0,8 µg/ml, de por lo menos 1 µg/ml, de por lo menos 1,5 µg/ml, y preferentemente de por lo menos 2 µg/ml, de por lo menos 5 µg/ml, de por lo menos 10 µg/ml, de por lo menos 15 µg/ml, de por lo menos 20 µg/ml, de por lo menos 25 µg/ml, de por lo menos 30 µg/ml, de por lo menos 35 µg/ml, de por lo menos 40 µg/ml, de por lo menos 50 µg/ml, de por lo menos 75 µg/ml, de por lo menos 100 µg/ml, de por lo menos 125 µg/ml, de por lo menos 150 µg/ml, de por lo menos 200 µg/ml, de por lo menos 250 µg/ml, de por lo menos 300 µg/ml, de por lo menos 350 µg/ml, de por lo menos 400 µg/ml, de por lo menos 450 µg/ml, puede administrarse en un ser humano para la prevención, control, tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por hLIGHT. Además, pueden utilizarse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis exacta que debe utilizarse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad mediada por hLIGHT, y deberá ser decidida según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.
- Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas a partir de sistemas experimentales *in vitro* o de modelo animal.
- Para los anticuerpos de la invención, la dosis administrada en el paciente típicamente es de entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del paciente. En algunas formas de realización, la dosis administrada en el paciente es de aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 75 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada en el paciente es de entre 1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferentemente de entre 1 mg/kg y 5 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos presentan una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunológica a los polipéptidos foráneos. De esta manera, las dosis más bajas de los anticuerpos humanos y la administración menos frecuente en muchas ocasiones resultan posibles. Además, la dosis y frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención puede reducirse incrementando la incorporación y penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones, tales como, por ejemplo, la lipidación.
- En una forma de realización, aproximadamente 100 mg/kg o menos, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos o aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la invención se administran 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o, preferentemente, 1 vez para controlar una enfermedad mediada por hLIGHT. En algunas formas de realización, un anticuerpo de la invención se administra aproximadamente 1 a 12 veces, en el que las dosis pueden administrarse según resulte necesario, por ejemplo, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente, trimestralmente, etc., según determine el médico. En algunas formas de realización, puede administrarse una dosis inferior (por ejemplo 1 a 15 mg/kg) más frecuentemente (por ejemplo, 3 a 6 veces). En otras formas de realización, puede administrarse una dosis superior (por ejemplo, 25 a 100 mg/kg) menos frecuentemente (por ejemplo, 1 a 3 veces). Sin embargo, tal como resultará evidente para el experto en la materia, otras cantidades y programas de administración resultarán fácilmente determinables y estarán comprendidos dentro del alcance de la invención.
- En una forma de realización específica, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos o aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la invención en una formulación de liberación sostenida se administran en el sujeto, preferentemente un ser humano, para evitar, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT. En otra forma de realización específica, un bolo de aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos,

aproximadamente 1 mg/kg o menos o aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la invención no en formulación de liberación sostenida se administra en el sujeto, preferentemente un ser humano, para prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT, y tras un determinado periodo de tiempo, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos o aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 5 mg/kg o menos de un anticuerpo de la invención en una formulación de liberación sostenida se administran en dicho sujeto (por ejemplo por vía intranasal o intramuscular) dos, tres o cuatro veces (preferentemente una vez). Según la presente forma de realización, un determinado periodo de tiempo puede ser 1 a 5 días, una semana, dos semanas o un mes.

En algunas formas de realización, se administra una única dosis de un anticuerpo de la invención en el paciente con el fin de prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce veces, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco o veintiséis a intervalos quincenales (por ejemplo, cada aproximadamente 14 días) durante el curso de un año, en el que la dosis se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, v aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (es decir, cada dosis mensual puede ser o no idéntica).

En otra forma de realización, se administra una única dosis de un anticuerpo de la invención en el paciente con el fin de prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce veces a intervalos aproximadamente mensuales (por ejemplo cada aproximadamente 30 días) durante el curso de un año, en el que la dosis se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, v aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (es decir, cada dosis mensual puede ser o no idéntica).

En una forma de realización, se administra una única dosis de un anticuerpo de la invención en el paciente con el fin de prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco o seis veces a intervalos aproximadamente quincenales (por ejemplo de cada aproximadamente 60 días) durante el curso de un año, en el que la dosis se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, v aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (es decir, cada dosis bimensual puede ser o no idéntica).

En algunas formas de realización, se administra una única dosis de un anticuerpo de la invención en el paciente con el fin de prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres o cuatro veces a intervalos aproximadamente trimestrales (por ejemplo cada aproximadamente 120 días) durante el curso de un año, en el que la dosis se selecciona de entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, v aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (es decir, cada dosis trimensual puede ser o no idéntica).

En determinadas formas de realización, la vía de administración para una dosis de un anticuerpo de la invención en el paciente es intranasal, intramuscular, intravenosa o una combinación de las mismas, aunque otras rutas indicadas en la presente memoria también resultan aceptables. Cada dosis puede administrarse o no por una vía de administración idéntica. En algunas formas de realización, puede administrarse un anticuerpo de la invención

por múltiples vías de administración simultánea o posteriormente a otras dosis del mismo anticuerpo o de anticuerpos diferentes de la invención.

En determinadas formas de realización, se administran anticuerpos de la invención profiláctica o terapéuticamente en el sujeto. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse profiláctica o terapéuticamente en el sujeto a fin de prevenir, reducir o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT o síntoma de la misma.

Terapia génica

En una forma de realización específica, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias codificantes de anticuerpos de la invención o derivados funcionales de los mismos, con el fin de prevenir, controlar, tratar y/o aliviar una enfermedad mediada por hLIGHT mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a una terapia realizada mediante la administración en el sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En una forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado y el anticuerpo media en un efecto profiláctico o terapéutico.

Pueden utilizarse cualesquiera de los métodos de terapia génica disponibles de la técnica según la presente invención. Se describen a continuación procedimientos ejemplificativos.

Para una revisión general de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy 12:488-505, 1993; Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596, 1993; Mulligan, Science 260:926-932, 1993, y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217, 1993, TIBTECH 11(5):155-215, mayo de 1993. Los métodos comúnmente conocidos de la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993, y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

En una forma de realización preferente, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo de la invención, siendo parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa el anticuerpo o proteínas quiméricas o las cadenas pesadas o ligeras de los mismos en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos presentan promotores, preferentemente promotores heterólogos, ligados operablemente a una región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra forma de realización particular, se utilizan moléculas de ácidos nucleicos en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualesquiera otras secuencias deseadas se encuentran flanqueadas por regiones que inducen la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codificantes de anticuerpo (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935, 1989; Zijlstra *et al.*, Nature 342:435-438, 1989). En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo de cadena sencilla; alternativamente, entre las secuencias de ácidos nucleicos se incluyen secuencias codificantes de tanto las cadenas pesadas como las ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos en el sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores portadores de los ácidos nucleicos, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro* y después se trasplantan en el sujeto. Estos dos enfoques son conocidos como terapia génica *in vivo* y *ex vivo*, respectivamente.

En una forma de realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, en donde las secuencias se expresan produciendo el producto codificado. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos de la técnica, por ejemplo mediante la construcción de los mismos como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y la administración del vector de manera que las secuencias sean intracelulares, por ejemplo mediante la infección con retrovirus defectivos o atenuados u otros vectores víricos (ver la patente US nº 4.980.286), o mediante la inyección directa del ADN desnudo, o mediante la utilización del bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont) o el recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, el encapsulado en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o mediante la administración de los mismos unidos a un péptido que es conocido que entra en el núcleo, mediante la administración del mismo unido a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987) (que pueden utilizarse para transportarse dirigidamente a tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. En otra forma de realización, pueden formarse complejos de ácidos nucleicos-ligandos en los que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico, los cuales alteran los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En todavía otra forma de realización, el ácido nucleico puede transportarse dirigidamente *in vivo* para la incorporación y expresión específica en la célula específica, mediante el transporte dirigido a un receptor específico (ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 92/06180, nº WO 92/22635, nº WO 92/20316, nº WO 93/14188 y nº WO 93/20221). Alternativamente, el ácido

nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para la expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935, 1989, y Zijlstra *et al.*, Nature 342:435-438, 1989).

En una forma de realización específica, se utilizan vectores víricos que contienen secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede utilizarse un vector retrovílico (ver Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217:581-599, 1993). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo que debe utilizarse en la terapia génica pueden clonarse en uno o más vectores, facilitando la administración del gen en el sujeto. Puede encontrarse más información sobre los vectores retrovíricos en Boesen *et al.*, Biotherapy 6:291-302, 1994, que describe la utilización de un vector retrovílico para administrar el gen *mdr 1* en células madre hematopoyéticas con el fin de que las células madre resulten más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran la utilización de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93:644-651, 1994; Klein *et al.*, Blood 83:1467-1473, 1994; Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141, 1993; y Grossman y Wilson, Curr. Opin. In Genetics and Devel. 3:110-114, 1993.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden utilizarse en terapia génica. Los adenovirus resultan vehículos especialmente atractivos para la administración de genes en los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios, en donde provocan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Los adenovirus presentan la ventaja de que son capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993, presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, Human Gene Therapy 5:3-10, 1994, demuestran la utilización de vectores adenovíricos para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos Rhesus. Pueden encontrarse otros casos de utilización de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld *et al.*, Science 252:431-434, 1991; Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143-155, 1992; Mastrangeli *et al.*, J. Clin. Invest. 91:225-234, 1993; publicación de patente PCT nº WO 94/12649, y Wang *et al.*, Gene Therapy 2:775-783, 1995. En una forma de realización preferente, se utilizan vectores adenovíricos.

Los virus adenoasociados (VAA) también han sido propuestos para la utilización en la terapia génica (Walsh *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300, y patente US nº 5.436.146).

Otro enfoque de la terapia génica implica transferir un gen a células en un cultivo de tejidos mediante métodos tales como la electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. A continuación, las células se someten a selección para aislar aquellas células que han incorporado y están expresando el gen transferido. Seguidamente las células se administran en el sujeto.

En dicha forma de realización, se introduce el ácido nucleico en la célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la transfección, la electroporación, la microinyección, la infección con un vector vírico o bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, la fusión celular, la transferencia génica mediada por cromosomas, la transferencia génica mediada por microcélulas, la fusión de esferoplastos, etc. Se conocen de la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células (ver, por ejemplo, Loeffler y Beher, Meth. Enzymol. 217:599-618, 1993; Cohen *et al.*, Meth. Enzymol. 217:618-644, 1993; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985) y pueden utilizarse según la presente invención, con la condición de que no se alteren las funciones del desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptores. La técnica debería proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse en el sujeto mediante diversos métodos conocidos de la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, las células madre o progenitoras hematopoyéticas) preferentemente se administran por vía intravenosa. La cantidad de células contemplada para la utilización depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por el experto en la materia.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para los fines de la terapia génica comprenden cualquier tipo celular disponible deseado, y entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo tal como se obtienen de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una forma de realización preferida, las células utilizadas para la terapia génica son autólogas del sujeto.

En una forma de realización en la que se utilizan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo de la invención se introducen en la célula de manera que sean expresables por las células o su progenie, y a continuación se administran las células recombinantes *in vivo* para el efecto terapéutico. En una forma de realización específica, se utilizan células madre o progenitoras. Potencialmente pueden utilizarse con dicha forma de realización de la presente invención cualesquiera células madre y/o progenitoras que puedan aislarse y mantenerse *in vitro* (ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT n° WO 94/08598; Stemple y Anderson, *Cell* 71:973-985, 1992; Rheinwald, *Meth. Cell Biol.* 21A:229, 1980, y Pittelkow y Scott, *Mayo Clinic Proc.* 61:771, 1986).

En una forma de realización específica, el ácido nucleico que debe introducirse para los fines de la terapia génica comprende un promotor inducible ligado operablemente a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico es controlable mediante el control de la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

Utilización diagnóstica de anticuerpos

Los anticuerpos marcados de la invención y derivados y análogos de los mismos, que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, pueden utilizarse con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad mediada por hLIGHT. La invención proporciona métodos para la detección de una enfermedad mediada por hLIGHT, que comprenden: (a) someter a ensayo la expresión de un antígeno hLIGHT en células o en una muestra de tejido de un sujeto utilizando uno o más anticuerpos de la invención que se une inmuno-específicamente al antígeno hLIGHT, y (b) comparar el nivel del antígeno hLIGHT con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normales (por ejemplo, de un paciente que no presenta una enfermedad mediada por hLIGHT, o del mismo paciente antes de la aparición de la enfermedad), en donde un incremento del nivel sometido a ensayo de antígeno hLIGHT en comparación con el nivel de control del antígeno hLIGHT es indicativo de una enfermedad mediada por hLIGHT.

La invención proporciona un ensayo diagnóstico para diagnosticar una enfermedad mediada por hLIGHT, que comprende: (a) someter a ensayo un nivel de un antígeno hLIGHT en células o en una muestra de tejido de un individuo utilizando uno o más anticuerpos de la invención que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, y (b) comparar el nivel del antígeno hLIGHT con un nivel de control, por ejemplo niveles en muestras de tejido normales, en donde un incremento del nivel de antígeno hLIGHT sometido a ensayo en comparación con el nivel de control del antígeno hLIGHT es indicativo de una enfermedad mediada por hLIGHT. Un diagnóstico más definitivo de una enfermedad mediada por hLIGHT podría permitir a los profesionales sanitarios utilizar medidas preventivas o un tratamiento agresivo más precozmente, previniendo de esta manera el desarrollo o progresión posterior de la enfermedad mediada por hLIGHT.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para someter a ensayo los niveles de antígeno hLIGHT en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos, tal como se indica en la presente memoria o tal como es conocido por el experto en la materia (por ejemplo, ver Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985, 1983, y Jalkanen *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096, 1987). Entre otros métodos basados en anticuerpos que resultan útiles para detectar la expresión génica de proteínas se incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcajes de ensayo de anticuerpos adecuados son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen marcajes enzimáticos, tales como, la glucosa oxidasa; isótopos radioactivos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcajes luminiscentes, tales como el luminol; y marcajes fluorescentes, tales como la fluoresceína, la rodamina y la biotina.

Un aspecto de la invención es la detección y el diagnóstico de una enfermedad mediada por hLIGHT en un ser humano. En una forma de realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) en un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado que se une inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT, b) esperar un intervalo de tiempo tras la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios en el sujeto en los que se expresa el antígeno hLIGHT (y para que la molécula marcada no unida sea lavada hasta el nivel de fondo), c) determinar el nivel de fondo, y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de manera que la detección de anticuerpo marcado a un nivel superior al de fondo indica que el sujeto presenta una enfermedad mediada por hLIGHT. El nivel de fondo puede determinarse mediante diversos métodos, incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar previamente determinado para un sistema particular.

Se aprecia en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes utilizado determinará la cantidad de fracción de obtención de imágenes necesaria para producir imágenes diagnósticas. En el caso de una fracción de isótopo radioactivo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada normalmente se encontrará comprendida entre aproximadamente 5 y 20 milicurios de ^{99}Tc . A continuación, el anticuerpo marcado se acumulará preferentemente en la localización de las células que contiene la proteína específica. La obtención de imágenes tumorales *in vivo* se describe en S.W. Burchiel *et al.*, *Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments* (capítulo 13 en *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of*

Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, editores, Masson Publishing Inc., 1982).

Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcaje utilizado y el modo de administración, el intervalo de tiempo tras la administración que permite que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y para que el anticuerpo marcado no lavado se lave hasta el nivel de fondo es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra forma de realización, el intervalo de tiempo tras la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En una forma de realización, la monitorización de una enfermedad mediada por hLIGHT se lleva a cabo mediante la repetición del método de diagnóstico de una enfermedad mediada por hLIGHT, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto utilizando métodos conocidos de la técnica para el escaneo *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcaje utilizado. El experto en la materia podrá determinar el método apropiado de detección de un marcaje particular. Entre los métodos y dispositivos que pueden utilizarse en los métodos diagnósticos de la invención se incluyen, aunque sin limitación, la tomografía computerizada (TC), el escaneo de cuerpo completo, tal como la tomografía de emisión de positrones (TEP), las imágenes de resonancia magnética (IRM) y la sonografía.

En una forma de realización específica, la molécula se marca con un isótopo radioactivo y se detecta en el paciente utilizando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston *et al.*, patente US nº 5.441.050). En otra forma de realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente utilizando un instrumento de escaneo sensible a la fluorescencia. En otra forma de realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente utilizando tomografía de emisión de positrones. En todavía otra forma de realización, la molécula se marca con un marcaje paramagnético y se detecta en el paciente utilizando la obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM).

Métodos de producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención que se unen inmuno-específicamente a un antígeno pueden producirse mediante cualquier método conocido de la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferentemente mediante técnicas de expresión recombinante. La práctica de la invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y campos relacionados comprendidos dentro de los conocimientos que posee el experto en la materia. Estas técnicas se describen en las referencias citadas en la presente memoria y se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, 1984; Eckstein (ed.), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press, 1991; Birren *et al.* (editores), Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Los anticuerpos policlonales que se unen inmuno-específicamente a un antígeno pueden producirse mediante diversos procedimientos bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, puede administrarse un antígeno humano en diversos animales huésped, incluyendo, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., con el fin de inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno humano. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, según la especie huésped, y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, solución de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas en superficie, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa americana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son bien conocidos de la técnica.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando una amplia diversidad de técnicas conocidas, incluyendo la utilización de tecnologías de hibridoma, de recombinación y de expresión génica, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas de la técnica y que se enseñan en, por ejemplo, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a edición, 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria no se encuentra limitada a anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. Otros métodos ejemplificativos de producción de anticuerpos monoclonales se comentan en otros sitios de la presente memoria, tal como, por ejemplo, la utilización de KM mouseTM. Se proporcionan métodos

ejemplificativos adicionales de producción de anticuerpos monoclonales en los Ejemplos de la presente memoria.

Los métodos para producir y cribar anticuerpos específicos utilizando tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos de la técnica. Brevemente, pueden inmunizarse ratones con un antígeno hLIGHT y tras detectar una respuesta inmunológica, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno hLIGHT en el suero del ratón, se recolecta el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación, se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas con cualesquiera células de mieloma adecuadas, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible de la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitante.

Además, puede utilizarse una técnica RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetida) para inmunizar un animal (Kilpatrick *et al.*, Hybridoma 16:381-9, 1997). A continuación, los clones de hibridoma se someten a ensayo mediante métodos conocidos de la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido e la invención. El líquido ascites, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, puede generarse mediante la inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos mediante el cultivo de una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo modificado e la invención, en el que, preferentemente, se genera el hibridoma mediante la fusión de esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno hLIGHT, con células de mieloma, y después se criban los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse al antígeno hLIGHT.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen antígenos hLIGHT específicos pueden generarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas, tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse utilizando diversos métodos de expresión génica conocidos de la técnica.

Por ejemplo, también pueden generarse anticuerpos utilizando diversos métodos de expresión génica. En los métodos de expresión génica, se expresan dominios de anticuerpo funcionales sobre la superficie de las partículas fágicas que portan las secuencias polinucleótidas que los codifican. En particular, se amplifican secuencias de ADN codificantes de los dominios VH y VL a partir de bibliotecas de ADNc animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humanas o murinas de los tejidos afectados). El ADN codificante de los dominios VH y VL se recombina con un conector scFv mediante PCR y se clona en un vector fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y se utiliza éste es infectado por fago ayudante. El fago utilizado en estos métodos típicamente es un fago filamentosos, incluyendo fd y M13, y los dominios VH y VL habitualmente se fusionan recombinantemente al gen fágico III o VIII. El fago que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno particular puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Entre los ejemplos de métodos de expresión génica que pueden utilizarse para generar los anticuerpos de la presente invención se incluyen los dados a conocer en Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods. 182:41-50, 1995; Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184:177-186, 1995; Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:952-958, 1994; Persic *et al.*, Gene 187:9-18, 1997; Burton *et al.*, Advances in Immunology 57:191-280, 1994; publicación de patente PCT nº GB91/O1 134, y las publicaciones de patente internacional nº WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 y WO97/13844, y las patentes US nº 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

Tal como se ha indicado en las referencias anteriormente indicadas, tras la selección génica, las regiones codificantes del anticuerpo en el fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, tal como se indica posteriormente. Las técnicas para producir recombinantemente los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden utilizarse mediante métodos conocidos de la técnica, tales como los dados a conocer en la publicación de patente PCT nº WO 92/22324, Mullinax *et al.*, BioTechniques 12(6):864-869, 1992; Sawai *et al.*, AJRI 34:26-34, 1995; y Better *et al.*, Science 240:1041-1043, 1988.

Con el fin de generar anticuerpos completos, los cebadores de PCXR, incluyendo las secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, pueden ser utilizados para amplificar las secuencias de VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por el experto en la materia, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VH, por ejemplo, la región constante gamma 4 humana y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VL, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de

conversión de cadena ligera seguidamente se cotransfectan en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan los anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, utilizando técnicas conocidas por el experto en la materia.

5 Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de los anticuerpos en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, puede resultar preferible utilizar anticuerpos humanos o híbridos. Los anticuerpos completamente humanos resultan particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Pueden generarse anticuerpos humanos mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica, incluyendo métodos de expresión fágica indicados anteriormente, utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de
10 inmunoglobulinas humanas. Ver también las patentes US nº 4.444.887 y nº 4.716.111, y las publicaciones de patente internacional nº WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

15 En formas de realización preferidas, se producen anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos y/o los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse utilizando cualquier método conocido de la técnica, incluyendo los Ejemplos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de gen de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón pueden convertirse en no funcionales separada o simultáneamente mediante la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas mediante
20 recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región J_H evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones híbridos. A continuación, se crían los ratones híbridos para producir progenie homocigótica que expresa los anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos son inmunizados de la manera habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de los ratones transgénicos humanizados utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B y posteriormente experimentan cambio de clase y mutaciones somáticas. De esta manera, utilizando dicha técnica resulta posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una vista general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 1995). Para un
25 comentario detallado de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para la producción de dichos anticuerpos, ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735, y las patentes US nº 5.413.923, 5.626.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Se detallan otros métodos en los Ejemplos de la presente memoria. Además, puede contactarse con compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), y Genpharm (San Jose, CA) para suministrar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Un anticuerpo híbrido es una molécula en la que se derivan diferentes partes del anticuerpo a partir de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos híbridos son conocidos de la técnica. Ver,
45 por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202, 1989, y las patentes US nº 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 y 6.331.415.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco con sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR con sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos un, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv) en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina humana (es decir, el anticuerpo donante) y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones marco son de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado comprende además por lo menos una parte e una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Habitualmente el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir además las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Habitualmente, el dominio constante es un dominio constante que fija el complemento en donde se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, y la clase típicamente es IgG1. En el caso de que dicha actividad citotóxica no resulta deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2. Entre los ejemplos de dominios constantes de VL y VH que pueden utilizarse en determinadas formas de realización de la invención se incluyen, aunque sin limitación, C-kappa y C-gamma-1 (nG1M), descritos en Johnson *et al.*, *J. Infect. Dis.* 175:1215-1224, 1997, y los indicados en la patente US nº 5.824.307. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias
50
55
60
65

de más de una clase o isotipo, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas se encuentran comprendido dentro de los conocimientos que posee el experto ordinario en la materia. Las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado no corresponden necesariamente de manera perfecta con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o el marco de consenso pueden haber sido mutagenizados por sustitución, inserción o delección de por lo menos un residuo de manera que el residuo de CDR o de marco en ese sitio no corresponda con el anticuerpo de consenso o el anticuerpo importado. Sin embargo, dichas mutaciones no serán extensas. Habitualmente, por lo menos el 75% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de FR y CDR parentales, con más frecuencia el 90%, y todavía más preferentemente, más del 95%. Los anticuerpos humanizados pueden producirse utilizando una diversidad de técnicas conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, la injertación de CDR (patente europea nº 239.400, la publicación de patente internacional nº WO 91/09967, y las patentes US nº 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), el recubrimiento o resuperficialización (patentes europeas nº 592.106 y nº 519.596; Padla, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498, 1991; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814, 1994, y Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969-973, 1994; la reorganización de cadenas (patente US nº 5.565.332) y las técnicas dadas a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 6.407.213 y nº 5.766.886, el documento nº WO 9317105; Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169:1119-25, 2002, Caldas *et al.*, *Protein Eng.* 13(5):353-60, 2000; Morea *et al.*, *Methods* 20(3):267-79, 2000; Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84, 1997; Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996; Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 Sup.):5973s-5977s, 1995; Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55(8):1717-22, 1995; Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10, 1994, y Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73, 1994. Ver también la publicación de patente US nº 2005/0042664 A1 (24 de feb., 2005). Con frecuencia, los residuos de marco en las regiones de marco se sustituirán por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente para mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos bien conocidos de la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de los residuos de CDR y de marco para identificar los residuos de marco importantes para la unión de antígenos y la comparación de la secuencia para identificar los residuos de marco no habituales en posiciones particulares (ver, por ejemplo, Queen *et al.*, patente US nº 5.585.089, y Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323, 1988).

Los anticuerpos de dominio único, por ejemplo, anticuerpos que no poseen cadenas ligeras, pueden producirse mediante métodos bien conocidos de la técnica. Ver Riechmann *et al.*, *J. Immunol.* 231:25-38, 1999; Nuttall *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 1(3):253-263, 2000; Muylderman, *J. Biotechnol.* 74(4):277302, 2001; patente US nº 6.005.079 y publicaciones de patente internacional nº WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 01/44301.

Además, los anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno hLIGHT pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imiten" un antígeno, utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Greenspan y Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444, 1989; y Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438, 1991).

Polinucleótidos codificantes de un anticuerpo

La invención proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos codificante de un anticuerpo de la invención que se une inmuno-específicamente a un epítipo de hLIGHT. La invención comprende además polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones de hibridación de alta, intermedia o baja astringencia, por ejemplo, tal como se ha indicado anteriormente, a polinucleótidos que codifican un anticuerpo modificado de la invención.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido de la técnica. Debido a que las secuencias de aminoácidos de E1, E13, E63, F19 y F23 son conocidas (ver, por ejemplo, las SEC ID nº 41, 42, 43, 44, 45, 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 y 50, y nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728, respectivamente, las secuencias de nucleótidos codificantes de dichos anticuerpos y las versiones modificadas de dichos anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien conocidos de la técnica, es decir, los codones de nucleótidos que es conocido que codifican aminoácidos particulares se ensamblan de manera que generen un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal como se indica en Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17:242, 1994), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen partes de la secuencia codificante del anticuerpo, fragmentos o variantes del mismo, hibridando y ligando dichos oligonucleótidos, y después amplifican los oligonucleótidos ligados, mediante PCR.

Alternativamente, un polinucleótido codificante de un anticuerpo de la exposición puede generarse a partir de un ácido nucleico de un origen adecuado (por ejemplo, un hibridoma con un nº de acceso ATCC PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819 o PTA-7728 (E1, E13, E63, F19 o F23)). En el caso de que un clon que contiene un ácido nucleico codificante de un anticuerpo particular no se encuentre disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo sea conocida, un ácido nucleico codificante de la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de un origen adecuado (por ejemplo una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar

un anticuerpo de la invención) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda oligonucleótida específica para la secuencia génica particular que debe identificarse, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados que se han generado por PCR seguidamente pueden clonarse en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido de la técnica.

En determinadas formas de realización, las moléculas de ácidos nucleicos de la exposición comprenden o consisten en una secuencia de ácidos nucleicos tal como se ilustra en cualquiera de las SEC ID nº 41, 42, 43, 44, 45 (codificante de un VH) y/o las SEC ID nº 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106 o 50 ((codificante de un VL), o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo como secuencia de nucleótidos codificante de un anticuerpo de la invención, tal como un anticuerpo de longitud completa, cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, o un anticuerpo de cadena única de la invención).

Expresión recombinante de un anticuerpo

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa, cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena única de la invención) que se une inmunoespecíficamente a un antígeno hLIGHT requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Tras obtener un polinucleótido codificante de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o un fragmento del mismo (preferentemente, aunque no necesariamente, que contenga el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas. De esta manera, en la presente memoria se describen los métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos codificante del anticuerpo. Los métodos, que son bien conocidos por el experto en la materia, pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Entre estos métodos se incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. De esta manera, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos codificante e una molécula de anticuerpo de la invención, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma, o una CDR de cadena pesada o ligera, operablemente ligada a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos codificante de la región constante de la molécula de anticuerpo (ver, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional nº WO 86/05807 y nº WO 89/01036, y la patente US nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada entera, la cadena ligera entera o las cadenas pesada y ligera enteras.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células transfectadas seguidamente se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. De esta manera, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido codificante de un anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o fragmento del mismo, o un anticuerpo de cadena única de la invención, operablemente ligado a un promotor heterólogo. En formas de realización preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores codificantes de tanto la cadena pesada como la ligera, pueden coexpresarse en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, tal como se detalla a continuación.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.807.715). Dichos sistemas de huésped-expresión representan vehículos mediante los que pueden producirse las secuencias codificantes de interés y seguidamente purificarse, aunque también representan células que pueden, al transformarse o transfectarse con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen las secuencias codificantes de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas por vectores de expresión virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo, o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHS, 293, NS0 y 3T3) que alojan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío adenovírico, el promotor del virus Vaccinia 7.5K). Para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, preferentemente se utilizan células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, las células de mamífero,

tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento promotor génico temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, Gene 45:101, 1986, y Cockett *et al.*, Bio/Technology 8:2, 1990). En formas de realización preferidas, los anticuerpos de la invención se producen en células CHO. En una forma de realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos codificantes de anticuerpos de la invención que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno hLIGHT está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de un tejido.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión, dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpos que se está expresando. Por ejemplo, en el caso de que deba producirse una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de la molécula de anticuerpo, pueden resultar deseables vectores que dirijan la expresión de niveles elevados de productos de proteína de fusión de fácil purificación. Entre estos vectores se incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO 12:1791, 1983), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el mismo marco que la región codificante *lacZ* de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109, 1985; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509, 1989) y similares. También pueden utilizarse los vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos en forma de proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa en una matriz, seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de corte de proteasa de trombina o factor Xa, de manera que el producto génico diana que se ha clonado pueda liberarse de la fracción GST.

En un sistema de insecto, se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como vector para la expresión de genes foráneos. El virus se multiplica en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, en el gen polihedrina) del virus y situarse bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor polihedrina).

En las células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utilice un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés puede ligarse con un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, este gen híbrido puede insertarse en el genoma adenovírico mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula del anticuerpo en los huéspedes infectados (por ejemplo, ver Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359, 1984). También pueden resultar necesarias señales de inicio específicas para la traducción eficiente de las secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Además, el codón de inicio debe encontrarse en la misma fase que el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccional y codones de inicio exógenos pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos intensificadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (ver, por ejemplo, Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153:51-54, 1987).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en el modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, la glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, el corte) de los productos proteicos pueden resultar importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras presentan características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación post-traduccional de las proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Con este fin, pueden utilizarse células hospedadoras eucarióticas que presenten la maquinaria celular para el procesamiento correcto del transcrito primario, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Entre dichas células hospedadoras de mamífero se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI138, BT483, HsS78T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y HsS78Bst. En formas de realización preferidas, los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de la invención se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, resulta preferente la expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse las líneas celulares que expresan establemente la molécula del anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, pueden transformarse las células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, secuencias de promotor e intensificador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse el crecimiento de las células manipuladas durante 1 a 2 días en un medio enriquecido y después cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células

integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan formando focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares manipuladas pueden resultar particularmente útiles en el cribado y evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden utilizarse varios sistemas de selección, incluyendo, aunque sin limitación, los genes de timidina cinasa del virus herpes simplex (Wigler *et al.*, Cell 11:223, 1977), de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202, 1992) y de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:8-17, 1980) en células tk⁻, hgprt⁻ y aprt⁻, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia antimetabolito como base para la selección para los genes siguientes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357, 1980; O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072, 1981); *neo*, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596, 1993; Mulligan, Science 260:926-932, 1993; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217, 1993; TIB TECH 11(5):155-215, mayo de 1993), e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147, 1984). Los métodos comúnmente conocidos de la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990, y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (editores), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY, 1994; Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1, 1981.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse mediante amplificación de un vector (para una revisión, ver Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). En el caso de que un marcador en el sistema vector que expresa el anticuerpo sea amplificable, el incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora incrementará el número de copias del gen marcador. Debido a que la región amplificada está asociada al gen de anticuerpo, también se incrementará la producción del anticuerpo (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257, 1983).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera. Alternativamente, puede utilizarse un único vector que codifique, y sea capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera debería situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:52, 1986; y Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-2199, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Tras la producción de una molécula de anticuerpo de la invención mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido de la técnica de purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, en particular mediante afinidad para un antígeno específico de la proteína A, y la cromatografía de columna de exclusión por tamaño), la centrifugación, la solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar de purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse con secuencias de polipéptido heterólogo indicadas en la presente memoria o de otro modo conocidas de la técnica para facilitar la purificación.

Kits

La invención proporciona además un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de la composición farmacéutica de la invención, tal como uno o más anticuerpos proporcionados en la presente memoria. Opcionalmente asociado a dicho recipiente o recipientes, puede encontrarse un impreso en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regule la fabricación, utilización o comercialización de los farmacéuticos o productos biológicos, que refleje la autorización por parte de dicha agencia de la fabricación, utilización o comercialización para la administración en el ser humano.

La presente invención proporciona kits que pueden utilizarse en los métodos anteriormente indicados. En una forma de realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una forma de realización específica, los kits de la presente invención contienen un antígeno hLIGHT sustancialmente aislado a modo de control. Preferentemente, los kits de la presente invención comprenden además un anticuerpo de control que no reacciona con el antígeno hLIGHT. En otra forma de realización específica, los kits de la presente invención contienen medios para detectar la unión de un anticuerpo modificado a un antígeno hLIGHT (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable, tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto

luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconozca el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En formas de realización específicas, el kit puede incluir un antígeno hLIGHT producido recombinantemente o sintetizado químicamente. El antígeno hLIGHT proporcionado en el kit también puede unirse a un soporte sólido. En una forma de realización más específica, los medios de detección del kit anteriormente indicado incluyen un soporte sólido al que se encuentra unido el antígeno hLIGHT. Dicho kit puede incluir además un anticuerpo antihumano marcado con informador no unido. En dicha forma de realización, la unión del anticuerpo al antígeno hLIGHT puede detectarse a partir de la unión de dicho informador-anticuerpo marcado.

Los ejemplos a continuación se ofrecen a título ilustrativo y no a título limitativo.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación de anticuerpos anti-HLIGHT humanos

En el presente ejemplo, se describe la generación de anticuerpos monoclonales anti-HLIGHT humanos utilizando ratones transgénicos (ratones KM miceTM) (documentos nº WO 02/43478 y nº WO 02/092812; Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2000; y Kataoka, IBC's 13th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2002) inmunizados con hLIGHT recombinante soluble. Los anticuerpos indicados anteriormente tienen específicamente líneas celulares establemente transfectadas con hLIGHT (EL4-HLIGHT y HEX 293-HLIGHT) y no las líneas celulares parentales. De manera similar, se unen a hLIGHT expresado endógenamente sobre la superficie del hibridoma de células T humanas (II-23.D7) (Ware *et al.*, Lymphokine Res. 5:313-24, 1986) con la activación. Conjuntamente, estos datos indican que los anticuerpos se unen inmunoespecíficamente a hLIGHT. Los anticuerpos aislados reconocen uno de los dos epítopos sobre hLIGHT según se determinó mediante experimentos de bloqueo cruzado, tal como se indica posteriormente. Además, los anticuerpos pudieron bloquear la unión de hLIGHT expresado sobre la superficie celular a las formas de fusión de receptor-Fc solubles de tanto HVEM como RLTβ humanos. hLIGHT soluble induce la secreción de las quimioquinas CCL20 y RANTES a partir de la línea celular epitelial colónica humana HT29.14s (ATCC HTB-38) de una manera dependiente de la dosis. La incubación de hLIGHT soluble con anticuerpos anti-HLIGHT bloquea la secreción mediada por hLIGHT de tanto CCL20 como RANTES a partir de células HT29.14s. Además, la preincubación de hLIGHT expresado sobre la superficie celular (EL4-HLIGHT) con dichos anticuerpos anti-HLIGHT bloquea la secreción de quimioquinas inducida por hLIGHT unido a membrana a partir de las células HT29. Conjuntamente, estos resultados ilustran las características funcionales y estructurales de los anticuerpos monoclonales anti-HLIGHT totalmente humanos y proporcionan evidencia de su utilidad en el tratamiento de las enfermedades mediadas por hLIGHT.

Materiales y métodos

Preparación del antígeno: el antígeno utilizado para las inmunizaciones en la generación de anticuerpos anti-HLIGHT totalmente humanos era una versión soluble de hLIGHT que estaba truncada para incluir únicamente la región extracelular, partiendo de la glicina en la posición aminoácida 66 hasta la valina 240, y contenía un epítipo FLAG en el extremo amino-terminal de la proteína (SEC ID nº 54). Se ha informado anteriormente de la producción de esta molécula (Rooney *et al.*, J. Biol. Chem. 275:14307-15, 2000).

El ácido nucleico (SEC ID nº 51) codificante de la secuencia de aminoácidos de hLIGHT de longitud completa (SEC ID nº 52) ha sido clonado a partir de células del hibridoma de células T II23.D7 activadas mediante PCR con transcriptasa inversa (Mauri *et al.*, Immunity 8:21-30, 1998). La línea celular II-23 (un subclón D7) es un hibridoma de células T CD4⁺ humanas (Ware *et al.*, Lymphokine Res. 5:313-24, 1986). El producto de PCR de hLIGHT se subclonó en el vector de expresión de mamífero pcDNA3.1 (+), creando pcDNA3.1-HLIGHT. El dominio extracelular (codificante de Gly66 a Val240) se amplificó a partir de pcDNA3-HLIGHT por PCR utilizando los cebadores siguientes con los sitios de restricción incorporados:

Directo, 5'-GTAGGAGAGATGGTCACCCGCCT-3' (SEC ID nº 80).

Inverso, 5'-GGAACGCGAATTCCCACGTGTCAGACCCATGTCCAAT-3' (SEC ID nº 81).

El producto de PCR de hLIGHT amplificado se digirió con EcoRI y se ligó en los sitios SnaB1 y EcoRI de pCDNA3.1-VCAM-FLAG, que codifica la secuencia líder de VCAM1 seguido del epítipo FLAG para la producción de la proteína secretada marcada N-terminalmente con FLAG (SEC ID nº 52).

Para producir una línea celular estable para la producción de hLIGHT soluble, se transfectaron células HEK293 utilizando el método de fosfato de calcio, y se seleccionaron clones estables con G418 (Invitrogen, Corp.) y se cribaron para la producción de hLIGHT mediante ELISA. Se purificó hLIGHT soluble a partir de sobrenadantes de cultivo de células cultivadas en DMEM que contenía suero fetal bovino definido al 1,0% (Hyclone Laboratories, Logan, UT). Se purificó hLIGHT soluble mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo anti-FLAG (M2) acoplado a perlas de agarosa. Se eluyó hLIGHT soluble de la columna utilizando glicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0 y se neutralizó el pH inmediatamente después de la recolección en Tris 50 mM, pH 7,4. Se determinó la

concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm.

Secuencia de nucleótidos de un hLIGHT desde el codón de inicio (ATG) hasta la parada (TGA) (SEC ID nº 51):

ATGGAGGAGA GTGTCGTACG GCCCTCAGTG TTTGTGGTGG ATGGACAGAC CGACATCCCA 60
TTCACGAGGC TGGGACGAAG CCACCGGAGA CAGTCGTGCA GTGTGGCCCG GGTGGSTCTG 120
GGTCTCTTGC TGTTCGTGAT GGGGGCCGGG CTGGCCGTCC AAGGCTGGTT CCTCCTGCAG 180
CTGCACTGGC GTCTAGGAGA GATGGTCACC CGCCTGCCTG ACGGACCTGC AGGCTCCTGG 240
GAGCAGCTGA TACAAGAGCG AAGGTCTCAC GAGGTCAACC CAGCAGCGCA TCTCACAGGG 300
GCCAACTCCA GCTTGACCGG CAGCGGGGGG CCGCTGTTAT GGGAGACTCA GCTGGGCCCTG 360
GCCTTCCTGA GGGGCCCTCAG CTACCACGAT GGGGCCCTTG TGGTCACCAA AGCTGGCTAC 420
TACTACATCT ACTCCAAGGT GCAGCTGGGC GGTGTGGGCT GCCCGCTGGG COTGGCCAGC 480
ACCATCACCC ACGGCCCTCTA CAAGCGCACA CCGCGCTACC CCGAGGAGCT GGAGCTGTTG 540
GTCAGCCAGC AGTCACCTG CGGACGGGCC ACCAGCAGCT CCCGGGTCTG GTGGGACAGC 600
AGCTTCCTGG GTGGTGTGGT ACACCTGGAG GCTGGGGAGG AGGTGGTCTG CCGTGTGCTG 660
GATGAACGCC TGGTTCGACT GCGTGATGTT ACCCGGTCTT ACTTCGGGGC TTTCATGGTG 720
5 TGA 780

Secuencia de aminoácidos de un hLIGHT de longitud completa 240 aa (SEC ID nº 52):

MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLMGAG LAVQGWFLQ 60
LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLIQERRSH EVNPAHLTG ANSSLTGSGG PLLWETQLGL 120
AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YYIYSKVQLG GVGCPGLAS TITHGLYKRT PRYPFEELELL 180
10 VSQQSPCGRA TSSSRVWWS SFLGGVVHLE AGEVVVRVL DERLVRLRDG TRSYFGAFMV 240

Secuencia de nucleótidos de un hLIGHT marcado con FLAG soluble (se muestran las secuencias líder de VCAM, seguido de las secuencias codificantes de FLAG en negrita) (SEC ID nº 53):

ATGCCTGGGA AGATGGTCTG GATCCTTGGA GCCTCAAATA TACTTTGGAT AATGTTTGCA 60
GCTTCTCAAG CTGACTACAA GGACGACGAT GACAAGTACG TAGGAGAGAT GGTACCCCGC 120
CTGCCTGACG GACCTGCAGG CTCCTGGGAG CAGCTGATAC AAGAGCGAAG GTCTCACGAG 180
GPCAACCCAG CAGCGCATCT CACAGGGGCC AACTCCAGCT TGACCGGCAG CGGGGGGCCG 240
CTGTTATGGG AGACTCAGCT GGGCCTGGCC TTCCTGAGGG GCCTCAGCTA CCACGATGGG 300
GCCCTTGTGG TCACCAAAGC TGGCTACTAC TACATCTACT CCAAGGTGCA GCTGGGCGGT 360
GTGGGCTGCC CGCTGGGCCT GGCCAGCACC ATCACCACAG GCCTCTACAA GCGCACACCC 420
CGCTACCCCG AGGAGCTGGA GCTGTTGGTC AGCCAGCAGT CACCCTGCGG ACGGGCCACC 480
AGCAGCTCCC GGGTCTGGTG GGACAGCAGC TTCCTGGGTG GTGTGGTACA CCTGGAGGCT 540
GGGGAGGAGG TGGTCGTCCG TGTGCTGGAT GAACGCCTGG TCGACTGCG TGATGGTACC 600
CGGTCTTACT TCGGGGCTTT CATGGTGTGA 660

Secuencia de aminoácidos de hLIGHT marcado con FLAG soluble 183 aa (FLAG en negrita) (SEC ID nº 54):

```

DYKDDDDKGE MVTRLPDGPA GSWEQLIQR RSHEVNPAAH LTGANSSLTG SGGPLLWETQ 60
LGLAFLRGLS YHDGALVVTK AGYYYIYSKV QLGGVGCPLG LASTITHGLY KRTPRYPEEL 120
ELLVSQQSPC GRATSSSRVW WDSSFLGGVV HLEAGEEVVV RVLDERLVRL RDGTRSYFGA 180
FMV 240

```

- 5 Se transfectaron establemente células EL4 (ATCC nº TIB-39) con un retrovirus que contenía el ADNc codificante de hLIGHT de longitud completa para la generación de la línea celular EL4-HLIGHT.

10 Preparación de proteína de fusión de Fc: la clonación, expresión y purificación de las proteínas de fusión de receptor solubles que contenían la región Fc de la IgG1 humana y los dominios de unión a ligando del RLTβ humano y HVEM humano han sido descritas anteriormente (Rooney *et al.*, Methods Enzymol. 322:345-63, 2000). Brevemente, se aislaron las regiones extracelulares de HVEM y RLTβ mediante reacciones en cadena de la polimerasa utilizando cebadores con sitios de endonucleasa de restricción incorporados y se ligaron en el mismo marco en el vector baculovirus pVL1392 (Pharmingen) que contenía la IgG1 de Fc humana. Se infectaron células de insecto *Trichoplusia ni* High-Five BTI-TN-5b1-4 (Tn5) (Invitrogen Corp.) con los baculovirus recombinantes RLTβ:Fc o HVEM:Fc para la producción de proteínas (ver purificación de anticuerpos y proteínas).

20 Ratones: se obtuvieron de Kirin Brewery Co., Ltd., Japón, ratones transgénicos humanos KM miceTM (documento nº WO 02/43478 y nº WO 02/092812, Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2000; y Kataoka, IBC's 13th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2002) que eran portadores de fragmentos de cromosoma humano codificantes de la región de inmunoglobulina humana, y se alojaron en las instalaciones para animales de Gemini Science (La Jolla, CA). Una vista general de la tecnología de producción de anticuerpos humanos se describe en Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93, 1995. Los animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana (kappa o lambda) que no expresan inmunoglobulinas endógenas se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5.939.598. Se describen métodos adicionales de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos (ver, por ejemplo, los documentos nº WO 98/24893, nº WO 92/01047, nº WO 96/34096 y nº WO 93/33735, y las patentes US nº 5.413.923, 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.885.793, 5.916.771 y 5.939.598). El desarrollo de bovinos portadores de genes de inmunoglobulina humana, vacas TC, se describe en Ishida y Lonberg (ver Ishida, 11th Antibody Engineering Meeting, 2000; Kuroiwa *et al.*, Nat. Genet. 36:775-80, 2004; Kuroiwa *et al.*, Nat. Biotechnol. 20:889-94, 2002).

35 Inmunización: se mezcló proteína recombinante hLIGHT soluble marcada con FLAG con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (ACF, Sigma) y se preparó una emulsión. Los ratones fueron inmunizados con 10 a 50 µg de proteína por vía subcutánea (s.c.) y recibieron un refuerzo s.c. de 10 a 20 µg de proteína emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (AIF, Sigma) a intervalos de 2 a 3 semanas durante 2 a 3 refuerzos. Se administró una inyección intravenosa (i.v.) final de 10 µg de hLIGHT soluble marcado con FLAG sin adyuvante 3 días antes de la fusión.

40 Producción de hibridoma: los ratones que mostraban el título de anticuerpos específicos anti-IgG de hLIGHT más alto en su suero, según se determinó mediante ELISA de hLIGHT y FACS utilizando células EL4 transducidas con hLIGHT frente a células EL4 parentales, se seleccionaron para la producción de anticuerpo monoclonales. Se recolectaron los bazo y se fusionaron suspensiones de células individuales con la línea celular de mieloma SP2/O-Ag14 (ATCC, Manassas, VA) en una proporción 5:1 con polietilenglicol al 50% (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Las fusiones se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad óptima (en este caso 1x10⁶/ml) en medio DMEM-10 completo (medio de Eagle modificado por Dulbecco con suero de feto bovino al 10% (FBS, Invitrogen, Corp.), aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina 2 Mm, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (todos de BioWhittaker, Walkersville, MD), complemento HAT (Sigma) y factor de clonación de hibridoma al 10% (FCH, Biovaris, San Diego, CA) y se cultivaron a 37°C en un incubador con 10% de CO₂. Se cribaron aproximadamente 2.800 pocillos de 2 fusiones mediante ELISA par anticuerpos específicos de hLIGHT que contenía kappa humana. Los anticuerpos IgG anti-HLIGHT humanos se confirmaron mediante análisis de citometría de flujo utilizando células hLIGHT+EL4 frente a células EL4 parentales. Los pocillos positivos también se sometieron a ensayo para la actividad de bloqueo de receptores mediante incubación de medio de cultivo por agotamiento de hibridoma en bruto con células EL4-HLIGHT y tinción con HVEM:Fc o RLTβ:Fc semisaturante. Los pocillos positivos se expandieron y se sometieron a 3 a 5 rondas de clonación por dilución limitante, obteniendo anticuerpos monoclonales.

60 Purificación de anticuerpos y proteínas: para la purificación de anticuerpos, se cultivaron hibridomas en botellas de cultivo giratorias de 2 litros con 350 mililitros a 1 litro/botella o en un sistema Integra de 1 litro (INTEGRA Bioscience, Inc., Ijamsville, MD) con medio sin suero (SFM) para hibridoma (Invitrogen, Corp.) complementado

con suero de feto bovino de contenido ultrabajo en IgG (Invitrogen, Corp.).

La producción de las proteínas recombinantes RL β :Fc y de HVEM:Fc humanas y de ratón ha sido descrita anteriormente (Rooney *et al.*, Meth. Enzymol. 322:345-63, 2000) y se generaron mediante la infección de 1 litro de células Tn5 en suspensión durante 4 días. Tanto los anticuerpos monoclonales humanos como las proteínas de fusión de Fc se purificaron a partir de medios de cultivo utilizando proteína A recombinante-gel Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences). El medio condicionado generado en las botellas giratorias en primer lugar se concentró utilizando un sistema de flujo tangencial Ultrasette (Pall Corp., East Hills, NY). El medio condicionado se filtró con una unidad de filtro de vacío de 0,22 μ m (Millipore, Bedford, MA) y se cargó en una columna de proteína A-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) de tamaño apropiado para la cantidad de anticuerpo humano en el medio. La columna se lavó intensivamente con 20 volúmenes de columna de PBS y el anticuerpo se eluyó con Gly-HCl 0,1 M, pH 3,6, NaCl 0,15 M, y se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones positivas se agruparon y se concentraron con un concentrador centrífugo (Vivaspin, valor de corte de peso molecular (MWCO): 50.000: Sartorius, Gettlingen, Alemania).

Se utilizaron columnas de desalado Sephadex G-25 (NAP, Amersham Biosciences) para el intercambio de tampón a PBS, pH 7,4. Finalmente, el anticuerpo se esterilizó mediante filtración utilizando filtros de jeringa con diámetros de poro de 0,22 μ m y se determinó la concentración de anticuerpo mediante el método de Lowry. Se determinó el contenido de pirógenos utilizando un ensayo de lisado de amebocito de *Limulus* (LAL) (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Los límites de detección de este ensayo eran de 0,06 EU/mg. En el caso de que el ensayo fuese negativo, se consideró que las muestras estaban libres de endotoxinas.

ELISA de cuantificación de IgG humana: para determinar la cantidad de anticuerpo humano presente en los sobrenadantes y stocks purificados, se utilizó el protocolo siguiente. Se utilizó anticuerpo de cabra específico anti-Fc γ humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) para recubrir placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) en tampón carbonato a razón de 0,5 μ g/pocillo durante 1 hora a 37°C. A continuación, se bloquearon las placas con Super block (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos, seguido de la adición de las muestras a las placas. Se generaron curvas patrón utilizando IgG humana total (Sigma) o IgG1 o IgG4 humana purificada (Kirin Brewery Co., Ltd.). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, se lavaron en PBS/BSA al 1%/Tween-20 al 0,1% (Sigma) y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo de cabra específico anti-Fc γ humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 1 hora a 37°C. Se añadió el sustrato TMB (Sigma) durante 10 minutos y se detuvo la reacción con H₂SO₄ (LabChem, Pittsburgh, PA). Se midió la DO a 450 nm en un lector de microplacas.

Cultivo de células de mamífero: la línea celular II-23 humana (subclón D7), una línea de hibridoma de células T CD4⁺ (Ware *et al.*, Lymphokine Res. 5:313-24, 1986) se mantuvo en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT) y 100 U/ml de penicilina/100 μ g/ml de estreptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY). La línea celular HT29.14s humana y la línea celular EL4-HLIGHT y la línea celular 293-HLIGHT se mantuvieron todas en DMEM que contenía FBS al 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT). Todas las células de mamífero se cultivaron en un incubador humidificado con 5% de CO₂ a 37°C.

ELISA de detección de anticuerpos anti-HLIGHT: los títulos de anticuerpo, especificidad y producido por los hibridomas se determinaron mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de fondo plano de 96 pocillos con 50 μ l de hLIGHT soluble marcado con FLAG a una concentración de 5 μ g/ml en tampón carbonato (pH 9,4) durante la noche a 4°C o a 37°C durante 1 hora. Tras lavar dos veces con PBS/Tween-20 al 0,1%, las placas se bloquearon con PBS/BSA al 1%/Tween-20 al 0,1% a 37°C durante 1 hora. El suero, el sobrenadante y el anticuerpo purificado se diluyeron en tampón de bloqueo, se añadieron a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween-20 al 0,1% y el anticuerpo de detección de oveja anti-kappa humano conjugado con peroxidasa (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) se añadió a una dilución de 1:2.000. Tras una incubación de 1 hora a 37°C, las placas se lavaron y se añadió el sustrato TMB (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ (LabChem) y se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas.

Citometría de flujo: se determinaron los títulos de anticuerpo, la especificidad y las afinidades de unión relativas mediante análisis de citometría de flujo utilizando líneas celulares EL4 estables transducidas con hLIGHT o la línea de células T II23.D7 activada con PMA 6 a 15 h (40 ng/ml) + yonomycin (500 ng/ml). Las células se lavaron una vez en tampón de tinción: PBS + FBS al 2% + Na₃ al 0,01% + EDTA 10 mM, y después se resuspendieron en suero, sobrenadante o anticuerpos purificados en un volumen de 50 μ l. Las células se incubaron con los anticuerpos sobre hielo durante 20 minutos, se lavaron dos veces en tampón de tinción y después se resuspendieron en anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana marcado con APC (anticuerpo de burro antihumano-APC, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Tras una incubación de 20 minutos sobre hielo, las células se lavaron una vez y se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 1% o se sometieron a un lavado final; a continuación, las células se resuspendieron en tampón de tinción y las muestras se capturaron utilizando citómetros de flujo FACScan o FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA). Los datos se analizaron utilizando el software CELLQUEST (Becton Dickinson Biosciences) o FLOW JO (TreeStar, Inc., San Carlos, CA).

Ensayos de bloqueo cruzado de anticuerpo anti-hLIGHT: se utilizó un protocolo de ELISA para determinar si los anticuerpos se unían al mismo epítipo de hLIGHT. Se recubrieron placas de ELISA de fondo plano de 96 pocillos NUNC con los anticuerpos anti-LIGHT humanos en tampón carbonato a una concentración de 2 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron y después se bloquearon con PBS/BSA al 1%/Tween-20. A continuación, los anticuerpos humanos anti-hLIGHT se preincubaron con hLIGHT soluble marcado con FLAG humano recombinante durante 30 minutos a 4°C. Las combinaciones de anticuerpo-proteína hLIGHT se añadieron a la placa y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Tras 3 lavados, se detectó el hLIGHT unido con Ig anti-marcador de epítipo FLAG de ratón-M2 conjugado con peroxidasa (Sigma). Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la DO de cada muestra según la fórmula siguiente: % de inhibición = (max. – muestra/max.)* 100.

Análisis de citocinas humanas: se midió un panel de 8 citocinas humanas en el medio crecimiento de las células HT29.14s tratadas, utilizando tecnología multiplex y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La detección de CCL20 en el medio de cultivo de las células HT29.14s se llevó a cabo mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo *in vitro* del bloqueo mediado por anticuerpo de la unión de LIGHT expresado sobre la superficie celular, a proteínas de fusión receptor soluble-Fc. Se incubaron células EL4 1e5 hLIGHT con concentraciones gradas de cada anticuerpo durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se añadieron cantidades subsaturantes de HVEM:Fc-biotina (3 µg/ml) o RLTβ:Fc-His (3 µg/ml) (Alexis Biochemicals) a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente las células se lavaron 2x con 200 µl de tampón de FACS (1X PBS, FBS al 2% + azida al 0,02%). Se detectó HVEM:Fc-biotina o RLTβ:Fc:His mediante una incubación de 30 minutos con SA-APC a 2,5 µg/ml o anti-His-HRP, respectivamente. A continuación, las células se analizaron en citómetros de flujo FACScaliber (Becton Dickinson). Las células muertas se separaron del gráfico de dispersión directa vs. Dispersión lateral y se calcularon las medias geométricas de cada histograma utilizando FLOWJO (TreeStar, San Carlos, CA, USA).

Aislamiento de genes de anticuerpo humano anti-hLIGHT. Se recolectaron mediante centrifugación células de hibridoma en cultivo (124E63, 124F23, 124E1, 124E13 y 124F19), que producen los anticuerpos E63 (IgG3), F23 (IgG4), E1 (IgG1), E13 (IgG1) y F19 (IgG1), respectivamente. Se purificó el ARN total de estas células utilizando el kit RNEASY (QIAGEN Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA) para la clonación del ADNc que codificaba la región variable de los genes de inmunoglobulina a partir del ARN celular total del hibridoma. Brevemente, se preparó el ADNc de primera cadena mediante transcripción inversa a partir de 2 microgramos de ARN. Se utilizó este ADNc como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región variable y una parte de la región constante de las cadenas pesada y ligera (VH y VL, respectivamente). Los cebadores 3' utilizados para la amplificación de los genes de cadena pesada y ligera en las regiones 5' RACE eran HH-2 (SEC ID nº 64) (región constante de cadena H) y HK-2 (SEC ID nº 65) (región constante de cadena ligera), respectivamente. Las secuencias amplificadas también contenían las secuencias líder. La reacción era la siguiente: 2,5 unidades de ADN polimerasa PFU ULTRA (Stratagene, La Jolla, CA), cebador 3' 0,2 µM (para la cadena pesada: IgG1p; para la cadena ligera: hk5, Tabla 2); 1X mezcla de cebadores universales para el extremo 5' (mezcla de cebadores UMP A incluida en el kit SMART RACE); 200 µM de mezcla de dNTP; MgCl₂ 1 Mm; tampón Puff Ultra (concentración final: 1x) y molde de ADNc.

El programa de termociclado era 5 ciclos de: 94°C x 30 s, 72°C x 3 min.; 5 ciclos de: 94°C x 30 s, 70°C x 30 s, 72°C x 3 min. 25 ciclos de: 94°C x 30 s, 68°C x 30 s, 72°C x 3 min., seguido de una extensión a 72°C x 7 min. Los fragmentos de ADN amplificado se recolectaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron con el kit de extracción de gel QIAQUICK (Qiagen Co., Ltd., Alemania). Los fragmentos de ADN purificados de VH y LV se integraron en el vector PCR 4 Blunt-TOPO utilizando el kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y cada constructo plásmido se transformó en *E. coli* y después se clonó. Las secuencias de nucleótidos de cada inserto (HV y LV) en los constructos plásmidos se analizaron utilizando cebadores universales específicos de vector M13F (SEC ID nº 58) y M13R (SEC ID nº 59). Basándose en la secuencia obtenida de VH y VL, se diseñaron cebadores oligonucleótidos para amplificar VH y VL respectivos (ver la Tabla 2).

Los ADNc codificantes de VH y VL de E63, F23, E1 y F19 se subclonaron por PCR a partir de los vectores PCR4 Blunt-TOPO en el vector de expresión de IgG1. Debido a que E13 es un subtipo de IgG1 con un hibridoma con una única cadena kappa (ver a continuación), no resultó necesario subclonar el ADNc de E13 en un vector de IgG1 para los análisis posteriores.

En primer lugar, se diseñaron cebadores oligonucleótidos que contenían los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción 5'-Sall y 3'-NheI para amplificar la región variable de la cadena pesada (VH) mediante PCR. Por ejemplo, en el caso de VH de E63, se llevó a cabo la PCR utilizando ADN mini-prep de pTopoE63VH como molde, y E63HF85 (SEC ID nº 60) y E63HR38 (SEC ID nº 61) como cebadores (ver la Tabla 2) con la ADN polimerasa PFU ULTRA. Tras la digestión con NheI y Sall, el producto de PCR se subclonó en el vector de

expresión de IgG1 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KGA1-Val Lark (un vector de modificado de N5KG1 (patente US nº 6.001.358)) que se predigirió con NheI y SalI (fragmento de ADN de 8,9 kilobases). La existencia de VH se analizó mediante digestión de restricción.

- 5 A continuación, los cebadores oligonucleótidos que contenían los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción 5' BglII y 3' BsiWI se diseñaron para amplificar la región variable de la cadena ligera (VL) mediante PCR. Por ejemplo, tras la subclonación de VH de E63 indicada anteriormente, se insertó VL de E63 en el vector N5KG1- Val Lark-VH mediante la digestión del vector de ADN con BglII y BsiWI. A continuación, se aisló el fragmento de ADN de 9,1 kb. De manera similar al constructo de VH, se diseñó un juego de cebadores para la PCR de VL que contuviese los sitios de reconocimiento para 5'BglII y 3'BsiWI. Estos cebadores, E63LF84 (SEC ID nº 62) y E63LR43 (SEC ID nº 63) fueron utilizados para amplificar VL a partir del ADN plasmídico mini-prep de pTopoE63VL. El producto de PCR se digirió con BglII y BsiWI y se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa y purificación en gel. Este fragmento, que contenía E63VL, se ligó con el vector preparado de 9,1 kb con ADN ligasa de T4 y se utilizó para transformar células Top10 (Invitrogen). Se seleccionaron los transformantes de *E. coli* positivos. Este vector de expresión, pG1K112E63 se purificó y la presencia de ambas regiones, E63VL y E63VH, se confirmó mediante análisis de restricción.

- La generación de vectores para producir los anticuerpos recombinantes F23G1, E1G1 y F19G1 se llevó a cabo de esencialmente la misma manera que para E63G1. La amplificación por PCR de VH de F23 se llevó a cabo utilizando F23HF86 (SEC ID nº 66) y F23HR55 (SEC ID nº 67). Los cebadores de amplificación de VL de F23 eran F23LF36 (SEC ID nº 68) y F23LR43 (SEC ID nº 69). La amplificación por PCR de VH de E1 se llevó a cabo utilizando E1HFSal1 (SEC ID nº 70) y E1HRNheI (SEC ID nº 71). La amplificación por PCR de E1VL kappa(A), E1VL kappa(B) y E1VL kappa(C) se llevó a cabo utilizando E1KF2+3BglII (SEC ID nº 74) emparejado con E1KR2BsiWI (SEC ID nº 75) o E1KR3BsiWI (SEC ID nº 76). La amplificación por PCR de VH de F19 se llevó a cabo utilizando F19HFSalI (SEC ID nº 72) y F19HRNheI (SEC ID nº 73). La amplificación por PCR de F19L kappa(A) y F19L kappa(B) se llevó a cabo utilizando F19KR1+2BsiWI (SEC ID nº 77) y F19KF1+2+3BglII (SEC ID nº 79). La amplificación por PCR de F19L kappa(C) se llevó a cabo utilizando F19KR3BsiWI (SEC ID nº 78) y F19KF1+2+3BglII (SEC ID nº 79). Los vectores resultantes, pKLG1/F23, pKLG1/E1 y pKLG1/F19, también se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación. F19L kappa(D) no se amplificó por PCR debido a un desplazamiento del marco de lectura, que se detectó mediante análisis de las escuencias, que produjo un segmento C-terminal del anticuerpo.

- Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena pesada (VH) de E63 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 43):

35 ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG
60
GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC
120
TGCATTGTCT CTGGTGGCTC CGTCAGCAGT GGTGGTTACT ACTGGAGCTG GATCCGGCAG
180
CCCCCAGGGA AGGGACTGGA GTGGATTGGG TATATCTATT ACAGTGGGAG CACCAACTAC
240
AACCCTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC
300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCTGCGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATGGATT
360
ACTATGTTTC GGGGAGTTGG GTTCGACCCC TGGGGCCAGG GAACCTGGT CACCGTCTCC
420
TCA
480

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera (VL) de E63 (entre el codón de inicio

(ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 48):

	<u>ATGTCGCCAT</u> CACAACATCAT TGGGTTTCTG CTGCTCTGGG TTCCAGCCTC CAGGGGTGAA	60
	ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTTCAG TCTGTGACTC CAAAGGAGAA AGTCACCATC	120
	ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG CATTGGTAGT AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT	180
	CAGTCTCCAA AGCTCCTCAT CAAGTATGCT TCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCCTCGAGG	240
	TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTT ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA	300
	GATGCTGCAG CATATTACTG TCATCAGAGT AGTAGTTTAC CTCTCACTTT CGGCGGAGGG	360
5	ACCAAGGTGG AGATCAAA	420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de cadena pesada de F23 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 45):

10	<u>ATGGACCTCC</u> TGCACAAGAA CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCCTCCTCCT GGTGGCAGCT	60
	CCCAGATGGG TCCTGTCCCA GGTGCAGCTA CAGCAGTGGG GCGCAGGACT GTTGAAGCCT	120
	TCGGAGACCC TGTCCCTCAC CTGCGCTGTC TATGGTGGGT CCTTCAGTGG TTACTACTGG	180
	AACTGGATCC GCCAGCCCCC AGGGAAGGGG CTGGAGTGGG TTGGGGAAAT CAATCAGTAC	240
	AACCCGTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC	300
	CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGATA	360
	GCAACAGCTG ATAAAGGGTA CTACGGTTTG GACGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC	420
	GTCTCCTCA	480

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de F23 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 50):

15	<u>ATGGACATGA</u> GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC	60
	AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA	120
	GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG	180
	AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGG AAGTGGGGTC	240
	CCATCAAGST TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG	300
	CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC GCTCACTTTC	360
	GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena pesada de E1 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 41):

20	<u>ATGGAGTTGG</u> GGCTGTGCTG GGTTTTCTTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT CCAGTGTGAG	60
	GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC	120
	TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTTCAGTAGA TTAAACATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA	180
	GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTTATACCAT ATACTACGCA	240
	GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGGATCTG	300
	CAAAATGAACA GCGTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG GAGTATAGCA	360
	GCAGCTTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAGCC CTGGTCAACG TCTCCTCA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 1 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 102):

25

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC	60
AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA	120
GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG	180
AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGGA AAGTGGGGTC	240
CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTCACCAT CAGCAGCCTG	300
CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCG TACACTTTTG	360
GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAA	420

- 5 Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 2 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 46):

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA	60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAACCTGGTA CCAGCAGAAA	180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA	240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTCTAG CAGTATGGTA GCTCAATGTA CACTTTTGGC	360
CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA	420

- 10 Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 3 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 103):

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA	60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	120
CTCTCCTACA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA	180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA ACAGGGCCAC TGGCATCCCA	240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTA CTGTCTAG CAGTATGGTA GCTCACCGTG GACGTTGGGC	360
CAAGGGACCA AGGTGGAAAT CAAA	420

- 15 Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena pesada de E13 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 42):

ATGGASTTTG GCGTGAGCTG GATTTTCCTT GCTGCGATTT TAAAAGGTGT CCACTGTGAG	60
GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTAAAGCCTG GGGGGTCCCT TAGACTCTCC	120
TGTGCAGCCT CTGGATTAC TCTCAGTAAC GCCTGGATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA	180
GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGGCCGTATT AAAAGCAAAA TAGATGGTGG GACAACAGAC	240
TACGCTGCAC CCGTGAAAGG CAGATTACAC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AACACGCTG	300
TTTCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG TACCACAGCA	360
ATGGCTGGTG CTTTTGGCTT TTGGGGCCAG GGAACCCCTG TCACCGTCTC CTCA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E13 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 47):

	<u>ATGGA</u> AAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA	60
	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	120
	CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA	180
	CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA	240
	GACAGGTTC A GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	300
	CCTGAAGATT TTGCACTGTA TTA CTGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCCTAT GTACACTTTT	360
5	GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACGA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena pesada de F19 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 44):

	<u>ATGAA</u> ACACC TGTGGTTCCT CCTCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG	60
	GTGCAGCTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC	120
	TGCGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCACTGGT TACAACIGGC ACTGGATCCG CCAGCCCCCA	180
	GGGAAGGGGC TGGAGTGGAT TGGGGAAATC ACTCATAGTG GAAGCACCAA TTACAACCCG	240
	TCCCTCAAGA GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG	300
	CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGTGCGAGA GATTGCAGTG	360
	GCTGGTACGG GCTACTACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC	420
10	TCA	480

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 1 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 104):

	<u>ATGG</u> ACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTAC TGCTCTGGGT CCCAGGTGCC	60
	AGATGTGACA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA	120
	GTCAACCATCA CTTGCCGGGT GAGTCAGGGC ATTAGCACTT ATTTAAATTG GTATCGGCAG	180
	AAACCAGGGA AAGTTCCTAA GCTCCTGATC TATAGTGCAI CCAATTTGCA ATCTGGAGTC	240
	CCATCTCGGT TCACTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACTAT CAGCAGCCTG	300
	CAGCCTGAAG ATGTTGCAAC TTATTACGGT CAACGGACTT ACAATGCCCC TCCCCTTTTC	360
15	GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 2 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 49):

	<u>ATGG</u> ACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGGT CCCAGGTGCC	60
	AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA	120
	GTCAACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGGGC ATTAACAGTG CTTTTGCCTG GTATCAGCAG	180
	AAACCAGGGA AAGTTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGG AAGTGGGGTC	240
	CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG	300
	CAGCCTGAAG ATTTTSCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC TCTCACTTTC	360
20	GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA	420

Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena kappa de F19 región nº 3 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 105):

ATGGACATGA	GGGTCCCCGC	TCAGCTCCTG	GGGCTCCTGC	TSCTCTGGCT	CCCAGGTGCC	60
AGATGTGTCA	TCTGGATGAC	CCAGTCTCCA	TCCTTACTCT	CTGCATCTAC	AGGAGACAGA	120
GTCACCATCA	GTTGTCCGAT	GAGTCAGGGC	ATTAGCAGTT	ATTTAGCCTG	GTATCAGCAA	180
AAACCAGGGA	AAGCCCCTGA	GCTCCTGATC	TATGCTGCAT	CCACTTTGCA	AAGTGGGGTC	240
CCATCAAGGT	TCAGTGGCAG	TGGATCTGGG	ACAGATTTCA	CTCTCACCAT	CAGCTGCCTG	300
CAGTCTGAAG	ATTTTGCAAC	TTATTACTGT	CAACAGTATT	ATAGTTTCCC	GTACACTTTT	360
GGCCAGGGGA	CCAAGCTGGA	GATCAAA				420

- 5 Secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena kappa de F19 región nº 4 (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable) (SEC ID nº 106):

ATGGAAGCCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	TACCACCGGA	60
GAAATTGTGT	TGACACAGTC	TCCAGCCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	120
CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GGGTGTTAGC	AGCTACTTAG	CCTGGTACCA	GCAGAAACCT	180
GGCCAGGCTC	CCAGGCTCCT	CATCTATGAT	GCATCCAACA	GGGCCACTGG	CATCCCAGCC	240
AGGTTTCAGTG	GCAGTGGGCC	TGGGACAGAC	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	CCTAGAGCCT	300
GAAGATTTTG	CAGTTTATTA	CTGTCAGCAG	CGTAGCAACT	GGCATCCCGT	TCGGCCAAGG	360
GACCAAGGTG	GAGATTCAAA					420

- 10 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de E63 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 3):

MKHLWF FLLL	VAAPRW LSQ	VQLQESGPGL	VKPSETLSLT	CIVSGGSVSS	GGYYWSWIRQ	60
PPGKLEWIG	YIIYSGSTNY	NPSLKSRVTI	SVDTSKNQFS	LKLSSVTAAD	TAVYYCARWI	120
TMFRGVGFDP	WGQGTLVTVS	S				180

- 15 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de E63 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 8):

MSPSQL IGFL	LLWVPAS RGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						180

- 20 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de F23 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 5):

MDLLHK NMKH	LWFFLL LVAA	PRWLSQ VQL	QQWAGLLKP	SETLSLTCAV	YGGSFSGYYW	60
NWIRQPPGKG	LEWIGEINQY	NPSLKSRVTI	SVDTSKNQFS	LKLSSVTAAD	TAVYYCAREI	120
ATADKGYGL	DVWGQGTTVT	VSS				180

- 25 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de F23 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 10):

MDMRVPAQ LL	GLLLWL PGA	RCALQ LQSP	SSLSASVGDR	VTITCRASQ	ISSALAWYQQ	60
KPGKAPKLLI	YDASSLESGV	PSRFSGSGSG	TDFTLTISSL	QPEDFATYYC	QQFNSYPLTF	120
GGGTKVEIK						180

- 30 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de E1 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 1):

MELGLC WVFL	VAILEG VQCE	VQLVESGGGL	VQPGGSLRLS	CAASGFTFSR	FNMNWRQAP	60
GKGLEWVSYI	SSSYTIYYA	DSVKGRFTIS	RDNAKNSLDL	QMNSLRDEDT	AVYYCARSIA	120

	AAFDYWGQGA LVTVSS	180
5	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 1 (E1kappa(A)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 82):	
	MDMRVPAQLL GLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDR VTITCRASQG ISSALAWYQQ	60
	KPGKAPKLLI YDASSLESQV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QGFNSYRTLL	120
	ARGPSWRS	180
10	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 2 (E1kappa(B)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 6):	
	METPAQLLFL LLLWLDDTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLTWYQQK	60
	PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSMYTFG	120
	QGTKLEIK	180
15	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de E1 región nº 3 (E1kappa(C)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 83):	
	METPAQLLFL LLLWLDDTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSYRASQSVS SSYLAWYQQK	60
	PGQAPRLLIY GASNRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG	120
	QGTKVEIK	180
20	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de E13 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 2):	
	MEFGLSWIFL AAILKGVQCE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTLSN AWMSWVRQAP	60
	GKGLEWVGRI KSKIDGGTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL FLQMNSLKTE DTAVYYCTTA	120
	MAGAFGFWGQ GTLVTVSS	180
25	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de E13 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 7):	
	METPAQLLFL LLLWLDDTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK	60
	PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPMYTF	120
	GQGTKLEIKR	180
30	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de F19 (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 4):	
	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YNWHWIRQPP	60
	GKGLEWIGEI THSGSTNYP SLKSRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCVREIAV	120
	AGTGYGMDV WGQGTTVTVS S	180
35	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 1 (F19kappa(A)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 90):	
	MDMRVPAQLL GLLLWVPGA RCDIQLTQSP SLSASVGDR VTITCRVSQG ISSYLNWYRQ	60
	KPGKVPKLLI YSASNLSQGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDVATYYC QRTYNAPPTF	120
	GGGTKVEIK	180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 2 (F19kappa(B)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 9):

```
MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDRTVTITCRASRG INSAFAWYQQ 60
KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQFNSYPLTF 120
GGGTKVEIK 180
```

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 3 (F19kappa(C)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 91):

```
MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCVIWMTQSP SLLSASTGDR VTISCRMSQG ISSYLAWYQQ 60
KPGKAPELLI YAASTLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISCL QSEDFATYYC QQYYSFPYTF 120
QGQTKLEIK 180
```

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera kappa de F19 región nº 4 (F19kappa(D)) (secuencia líder (en negrita) y región variable) (SEC ID nº 92):

```
MEAPAQLLEL LLLWLPTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVSYLAWYQQKP 60
GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RPSGSGPGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHFVRPR 120
DQGGDS 180
```

Tabla 2: cebadores de ADN sintetizados

SEC ID nº	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Longitud
55	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22-mero
56	IgG1p	TCTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31-mero
57	HK5	AGGCACACAACAGACGCAGTTGCAGATTTC	30-mero
58	M13F	GTAAGACGACGGCCAGTG	18-mero
59	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-mero
60	E63HF85	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41-mero
61	E63HR38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-mero
62	E63LF84	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGTCGCCATCACAACCTATTG	42-mero
63	E63LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mero
64	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTG	25-mero
65	HK-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC	26-mero
66	F23HF86	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACCTCCTGCACAAGAAC	41-mero
67	F23HR55	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGT	34-mero
68	F23LP36	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42-mero
69	F23LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mero
70	E1HFSall	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGG	41-mero
71	E1HRNheI	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGC	37-mero
72	F19HFSall	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41-mero
73	F19HRNheI	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT	37-mero
74	E1KF2+3BgIII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC	42-mero
75	E1KR2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTG	40-mero
76	E1KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTCCACCTTGGTCCCTTG	40-mero
77	F19KR1+2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGRTCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mero
78	F19KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTG	40-mero
79	F19KF1+2+3BgIII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42-mero

Se describe KM mouseTM en, por ejemplo, Fishwild *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-51, 1996; Lonberg *et al.*, Nat. Biotechnol. 9:1117-1125, 2005; Tomizuka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-7, 2000; Tomizuka, Nat. Genet. 16:133-43, 1997. Debido a la naturaleza de KM mouseTM (por ejemplo, se ha integrado más de un gen de cadena kappa en el genoma murino al generar la cepa transgénica kappa) resultó posible disponer de más de un ADNc de cadena ligera kappa expresado a partir de un hibridoma clonal. Para determinar si ello era de esta manera, se secuenció un mínimo de diez clones de ADNc. En los casos en que se aislaba más de un ADNc de anticuerpo de cadena ligera kappa (por ejemplo, E1 y F19), se generaron varios constructos que contenían las diversas parejas de ADNc de cadena pesada combinados con cada ADNc de kappa. Estos constructos de expresión se transfectaron en células 293F utilizando 293FECTIN (Invitrogen, San Diego, CA). A continuación,

se sometieron a ensayo sobrenadantes del cultivo de setenta y dos horas para actividad de anticuerpo con el fin de identificar la pareja o parejas de cadena pesada y ligera correctas que se unían inmuno-específicamente a hLIGHT (por ejemplo, mediante transferencia western, ELISA u otro método similar). Hacer referencia al Ejemplo 3, posteriormente, para un método ejemplificativo de caracterización de anticuerpos (por ejemplo, E1 y F19) con múltiples cadenas kappa.

Producción de anticuerpo anti-hLIGHT humano recombinante a partir de células 293F: se mantuvieron cultivos en suspensión de células 293F en medio de expresión Freestyle 293 bajo agitación a ~120 rpm/min. En un incubador humidificado con 8% de CO₂ a 37°C. Para la expresión transitoria de anticuerpos recombinantes, se transfectaron 3x10⁷ células 293F con 30 µg de cada plásmido codificante de las versiones de IgG1 recombinantes de los anticuerpos anti-hLIGHT E63 o F23 utilizando 293-fectin (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó que los transfectantes crecieran en suspensión en 30 ml de medio de expresión FREESTYLE 293 durante 5 días bajo condiciones de crecimiento normales. Se recolectó el medio de crecimiento y se separaron las células mediante centrifugación a una velocidad de 300 g seguido de filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Se determinó la concentración de anticuerpo presente en este material no purificado mediante ELISA de IgG_h y se utilizó para los ensayos *in vitro* con el fin de evaluar las propiedades funcionales de los anticuerpos de cambio de subclase.

Resultados

Se inmunizaron ratones KM miceTM con hLIGHT marcado con FLAG soluble recombinante en CFA/IFA. Algunos de los ratones generaron anticuerpos específicos anti-hLIGHT, con un abanico de títulos específicos de IgG humano de hLIGHT medidos mediante ELISA y análisis de FACS con tinción de células EL4-hLIGHT. Los esplenocitos de los respondedores más altos se fusionaron con células de mieloma para generar hibridomas productores de anticuerpos anti-hLIGHT humanos. La producción de anticuerpos anti-hLIGHT por los hibridomas individuales se determinó en el cribado primario mediante ELISA anti-ELISA_h. En este cribado, se utilizó el anticuerpo anti-FLAG para recubrir la placa de captura de hLIGHT recombinante marcado con FLAG en un esfuerzo que tuvo éxito de enmascarar el epítipo FLAG y evitar el aislamiento de hibridomas productores de anticuerpos anti-FLAG. Los medios de los clones positivos en el ELISA se utilizaron en un cribado secundario mediante tinción en citometría de flujo de la línea celular EL4-hLIGHT con el fin de confirmar la identificación de los anticuerpos que se unían inmuno-específicamente a la forma nativa de hLIGHT.

Se sometieron a ensayo los hibridomas positivos para actividad antagonista mediante la clasificación de la capacidad de los anticuerpos producidos por el hibridoma de bloquear la unión de HVEM:Fc y de RLTβ:Fc a las células EL4-hLIGHT. Esta actividad de bloqueo se normalizó respecto a la concentración de anticuerpo determinada mediante el ELISA de IgG humana. Los 15 mejores candidatos se clonaron mediante dilución limitante para rendir hibridomas monoclonales, mientras que el resto se congeló. Se produjeron purificaciones a pequeña escala a partir de los cultivos de extinción (<1 mg) de dichos 15 anticuerpos para la caracterización adicional y clasificación basándose en los criterios siguientes: afinidad de unión relativa para hLIGHT, capacidad de bloquear la unión de HVEM:Fc y de RLTβ:Fc humanas a las células EL4-hLIGHT, bloqueo cruzado entre sí y capacidad de bloquear la secreción de quimioquinas mediada por hLIGHT expresado en la superficie celular y soluble a partir de la línea celular epitelial colónica HT29.14s. Basándose en estos estudios, se presentan las propiedades de los 5 mejores candidatos (E1, E13, E63, F23 y F19) en la figura 3.

Los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT E1, E13, E63, F23 y F19 se unieron, cada uno, de manera específica a la línea de células T humanas activadas (II23.D7) y a la línea celular expresante de hLIGHT estable EL4-hLIGHT, pero no a la línea EL4 parental ni a las células en reposo II23.D7 (figura 1A). La unión de dichos anticuerpos humanos anti-hLIGHT alcanzó la saturación (figura 1B). La afinidad de unión de estado estable funcional de cada anticuerpo se determinó mediante titulación de la cantidad de anticuerpo necesaria para marcar las células EL4-hLIGHT (figuras 2A y 2B). Se llevó a cabo un análisis de regresión no lineal para determinar la medición de afinidad de unión funcional o EC50 de cada candidato (figura 3). Se observó un abanico de afinidades funcionales. Se consideró que una EC50 baja, así como un nivel elevado de tinción (intensidad media de fluorescencia (IMF)) en la saturación eran ideales durante el procedimiento de clasificación y selección.

Los anticuerpos se sometieron a ensayo mediante ELISA para determinar si competían entre sí para la unión a hLIGHT soluble (figura 4). Se identificaron en este análisis dos grupos de epítipo de hLIGHT. Los "anticuerpos E" (E1, E13 y E63) se bloqueaban cruzadamente entre sí, y los "anticuerpos F" (F19 y F23) se bloqueaban cruzadamente entre sí. Sin embargo, los "anticuerpos E" no eran capaces de bloquear cruzadamente a los "anticuerpos F", y viceversa. Tal como se esperaba, todos los anticuerpos se bloqueaban a sí mismos en este ensayo.

La capacidad de E1, E13, E63, F23 y F19 de bloquear la unión de las proteínas de fusión humanas HVEM:Fc y RLTβ:Fc a hLIGHT expresado en la superficie celular utilizando ensayos basados en la citometría de flujo se muestra en las figuras 5A y 5B, y en las figuras 6A y 6B, respectivamente. En estos experimentos, se añadieron cantidades gradadas de cada anticuerpo a la línea celular EL4-hLIGHT, seguido de la adición de una cantidad

subsaturante de la proteína de fusión de receptor. Las proteínas de fusión de receptor se detectaron con anticuerpos anti-His para RLTβ:Fc marcado con His o estreptavidina-PE para HVEM:Fc biotinilado. Tal como se muestra, cada uno de los anticuerpos bloqueó la unión de cualquiera de las proteínas de fusión de receptor a hLIGHT, en contraste con el anticuerpo de control anti-M2 de influenza totalmente humano, que no presentó ningún efecto sobre la unión de ninguno de los receptores de Fc. En cada experimento, todos los anticuerpos bloquearon la unión de receptores de una manera dependiente de la dosis, permitiendo el análisis mediante regresión no lineal para determinar la dosis IC₅₀ (figura 3). Estos valores se tomaron en consideración al clasificar los potenciales candidatos.

Para demostrar directamente que los anticuerpos antagonistas de la invención bloquean la señalización mediada por hLIGHT, se realizó un ensayo para medir la señalización mediada por hLIGHT *in vivo*. Con este fin, la línea celular epitelial colónica HT29.14s, que expresa tanto RLTβ como HVEM, se trató con cantidades gradadas de hLIGHT soluble y se analizó el medio de crecimiento para la presencia de citocinas secretadas durante un curso temporal de varios días. Utilizando ELISA estándares y análisis multiplex de matrices de suspensión, se determinó que hLIGHT inducía CCL20, IL-8 y RANTES de una manera dependiente de la dosis (figura 7 y figuras 8A y 8B). La figura 7 representa una titulación de dosis de hLIGHT soluble recolectado el día 3. Se utilizó FNT recombinante a modo de control positivo para la inducción de quimioquina mediante los receptores de FNT, mientras que se utilizó la linfotóxina (LTα₁β₂) como control positivo para la señalización mediante RLTβ. Se utilizó fosfatasa alcalina bacteriana marcada con FLAG (FLAG-BAP) como proteína irrelevante marcada de control negativo. Tal como se esperaba, los niveles de quimioquinas producidos mediante el contacto de las células con hLIGHT fueron equivalentes a los inducidos por LTαβ, mientras que FNT resultó más eficaz en la inducción de CCL20 e IL-8, aunque indujo niveles similares de RANTES. Se utilizó este ensayo de respuesta celular para medir la señalización de hLIGHT y para evaluar la capacidad de los anticuerpos de la invención de bloquear los sucesos de señalización mediada por hLIGHT *in vitro*.

En el ensayo de inducción de HT29.14s mediada por hLIGHT de CCL20, se preincubaron cantidades gradadas de los anticuerpos anti-hLIGHT con una cantidad constante de hLIGHT soluble recombinante y después se añadió a las células HT29.14s (figura 9). Se sometieron a ensayo los niveles de quimioquina el día 3 o 4 después del tratamiento y se compararon con los niveles inducidos por hLIGHT soluble sola o hLIGHT soluble preincubado con una proteína anti-M2 de influenza totalmente humana irrelevante a modo de control de isotipo. En estos ensayos, los anticuerpos de la invención sometidos a ensayo en la presente memoria bloquearon la inducción de CCL20 mediada por hLIGHT soluble de una manera dependiente de la dosis. En algunos casos el análisis de regresión no lineal pudo producir valores de IC₅₀.

Sin deseo de restringirse a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que la señalización iniciada por la unión de LIGHT en la superficie celular a sus receptores afines sobre otras células podría resultar crucial para ejercer la actividad coestimuladora de las células T observada mediante interacciones de HVEM o una producción de quimioquinas incrementada mediante RLTβ expresada sobre las células de origen estromal o epitelial en el intestino, bazo o ganglios linfáticos. La inducción de CCL20 en el intestino aparentemente está regulada más por la expresión de los ligandos de RLTβ sobre las células que entran en contacto con las células epiteliales que por factores solubles (Rumbo *et al.*, Gastroenterology 127:213-23, 2004). Por lo tanto, se desarrolló un ensayo de señalización de LIGHT en la superficie celular con el fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos de la presente invención de bloquear hLIGHT en la superficie celular. En este ensayo, se utilizaron células EL4-HLIGHT fijadas con formalina de inducir quimioquinas mediante la incubación de las mismas con células HT29.14s de una manera similar al ensayo con hLIGHT soluble. Estas células indujeron CCL20 y RANTES a niveles equivalentes a hLIGHT soluble. Al preincubar cantidades gradadas de anticuerpos anti-hLIGHT con células EL4-HLIGHT fijada, se bloqueó la inducción de RANTES a niveles observados al no añadir células expresantes de hLIGHT (figura 10). En experimentos idénticos, de manera similar resultó inhibido CCL20. Conjuntamente, estos datos indican que los anticuerpos de la invención pueden bloquear la señalización *in vitro* tanto de hLIGHT soluble como de hLIGHT unido a membrana.

Ejemplo 2 – Caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón antihumanos disponibles comercialmente

Bloqueo cruzado de anticuerpos. Se llevaron a cabo experimentos de bloqueo cruzado tal como se indica en el Ejemplo 1, utilizando anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de ratón disponibles de R&D Systems ("mAb de ratón de R&D") y Abnova ("mAb de ratón de Abnova"), así como los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos identificados en el Ejemplo 1, para evaluar qué epítipo de hLIGHT se une a los anticuerpos. Se presentan los resultados en la figura 11

Los resultados demuestran que el mAb de ratón de R&D se une al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales humanos E1, E13 y E63 ("anticuerpos E humanos"), así como al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales humanos F19 y F23 ("anticuerpos F humanos"). De esta manera, en contraste con los anticuerpos monoclonales E y F anti-hLIGHT humanos identificados en el ejemplo 1, en el que se encontró que se unían inmunoespecíficamente a sólo uno de dos epítopos diferentes, el mAb de ratón de R&D se unía a ambos grupos de epítopos de hLIGHT. Es decir, los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos identificados

en le Ejemplo 1 no se bloquearon cruzadamente entre sí. Los anticuerpos E humanos bloquearon cruzadamente otros anticuerpos E humanos, y los anticuerpos F humanos bloquearon cruzadamente otros anticuerpos F humanos, mientras que los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos fueron todos capaces de bloquear cruzadamente el mAb de ratón de R&D. De manera similar, el mAb de ratón de R&D bloqueó cruzadamente los anticuerpos E humanos, así como los anticuerpos F humanos.

Los resultados también demuestran que el mAb de ratón de Abnova no se une a ninguno de los epítopos al que sí se unían los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos. Es decir, el mAb de ratón de Abnova no resultó bloqueado cruzadamente por ninguno de los anticuerpos humanos E1, E13, E63, F19 o F23, ni el mAb de ratón de Abnova pudo bloquear cruzadamente ninguno de los anticuerpos humanos E1, E13, E63, F19 o F23.

Actividad de bloqueo de anticuerpos de la unión de HVEM:Fc a las células 293 hLIGHT.

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-hLIGHT E1, E13 y F19, el mAb de ratón de R&D, los anticuerpos policlonales de cabra anti-hLIGHT disponibles comercialmente (R&D Systems) y los anticuerpos policlonales de conejo anti-hLIGHT (eBioscience) fueron sometidos a ensayo para su capacidad de bloquear la unión de HVEM:Fc a las células 293 que expresan hLIGHT tal como se indica en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados en la figura 12 y en la figura 14B. La totalidad de los cuatro anticuerpos monoclonales pudo inhibir la unión de una manera dependiente de la dosis, según se determinó mediante análisis de FACS. Los anticuerpos policlonales de cabra de R&D también pudieron inhibir la unión de HVEM:Fc, mientras que el anticuerpo policlonal de conejo de eBioscience no inhibió la unión.

Actividad de bloqueo de anticuerpos de la unión de RLTβ:Fc a las células 293 hLIGHT.

Se sometieron a ensayo para su capacidad de bloquear la unión de RLTβ:Fc a las células 293 que expresan hLIGHT tal como se indica en el ejemplo 1, los anticuerpos monoclonales humanos anti-hLIGHT E1 y E13, el mAb de ratón de R&D, los anticuerpos policlonales de cabra anti-hLIGHT disponibles comercialmente (R&D Systems) y los anticuerpos policlonales de conejo anti-hLIGHT (eBioscience). Se muestran los resultados en la figura 13 y en la figura 14B. La totalidad de los cuatro anticuerpos monoclonales pudo inhibir la unión de una manera dependiente de la dosis, según se determinó mediante análisis de FACS. Los anticuerpos policlonales de cabra de R&D también pudieron inhibir la unión de RLTβ:Fc, mientras que el anticuerpo policlonal de conejo de eBioscience no pudo.

Unión a hLIGHT nativa y desnaturalizada. Se sometieron a ebullición cinco microgramos de LIGHT humano soluble en 2x tampón para muestras SDS (desnaturalizado) o no se trataron (nativo) y después ambos fueron diluidos en serie en incrementos de 6x. Se aplicaron puntos de 5 µl de cada dilución de hLIGHT simultáneamente sobre membranas de PVDF de 0,2 µm hidratadas (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando una pipeta multicanal de 8 canales. Se dejó que las membranas se secasen al aire y después se rehidrataron, se bloquearon (1x TBST (solución salina tamponada con Tris Tween-20) + leche desnatada al 2,5% + azida sódica al 0,02%). Cada membrana se sondeó con 5 µg/ml de cada anticuerpo primario (ver posteriormente). Las membranas se lavaron 3x en 1x TBST seguido de anticuerpos secundarios biotinilados (biotina-α de cabra antihumano (Vector Labs, Burlingame, CA), biotina-α de cabra antiratón (Jackson Labs, Bar Harbor, ME), biotina-α de ratón anticabra (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)) a una concentración de 5 µg/ml. Las membranas se lavaron 3x en 1x TBST seguido de super SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se utilizó la quimioluminiscencia para la detección utilizando el kit de detección ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se visualizó la señal mediante exposición a película de obtención de imágenes X-OMAT AR (Kodak, Rochester, New York).

Los anticuerpos primarios sometidos a ensayo eran los mAb humanos anti-hLIGHT E1, E13, E63, F19 y F23 (Ejemplo 1), anticuerpos monoclonales murinos anti-hLIGHT disponibles comercialmente de R&D Systems ("mAb de ratón de R&D") y de Abnova ("mAb de ratón de Abnova"), una preparación de anticuerpo policlonal de cabra anti-hLIGHT ("pAb de cabra de R&D", de R&D Systems) y dos preparaciones de anticuerpo policlonal de conejo anti-hLIGHT ("pAb de conejo de eBioscience", de eBioscience, y "pAb de conejo de Preprotech", de Preprotech).

Los resultados se muestran en la figura 15 y en la figura 16. Los "anticuerpos E" monoclonales humanos anti-hLIGHT de la exposición (E1, E13 y E63) sometidos a ensayo en el presente ensayo se unen inmuno-específicamente a formas tanto nativas como desnaturalizadas de hLIGHT soluble (figura 15A y figura 16). El anticuerpo E63 se une inmuno-específicamente a concentraciones más bajas de hLIGHT nativo (límite inferior de detección: 3,9 ng de hLIGHT nativo) que hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 139 ng de hLIGHT desnaturalizado). El anticuerpo E1 también se une inmuno-específicamente a concentraciones más bajas de hLIGHT nativa (límite inferior de detección: 23 ng de hLIGHT nativa) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 139 ng de hLIGHT desnaturalizado). El anticuerpo E13 se une inmuno-específicamente a formas tanto nativas como desnaturalizadas de hLIGHT con el límite inferior de detección en 0,64 ng para ambas formas de hLIGHT.

En contraste con los "anticuerpos E" monoclonales humanos anti-hLIGHT, los "anticuerpos F" monoclonales

humanos anti-HLIGHT de la invención (F19 y F23) sometidos a ensayo en el presente ensayo se unen inmuno-específicamente a la forma nativa de hLIGHT soluble (límite inferior de detección: 23 ng de hLIGHT nativo) pero no a la forma desnaturalizada, incluso a las concentraciones más altas (>5.000 ng) de hLIGHT desnaturalizado (figura 15A y figura 16).

Cada uno de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-HLIGHT disponibles comercialmente (mAb de ratón de R&D y mAb de ratón de Abnova) sometidos a ensayo en el presente ensayo se unen inmuno-específicamente a las formas tanto nativa como desnaturalizadas de hLIGHT soluble. El mAb de ratón de R&D se une inmuno-específicamente a concentraciones más bajas de hLIGHT nativo (límite inferior de detección: 23 ng de hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 139 ng de hLIGHT desnaturalizado). El mAb de ratón de Abnova se une inmuno-específicamente a concentraciones aproximadamente iguales de las formas tanto nativa como desnaturalizadas de hLIGHT soluble (límite inferior de detección: 0,64 ng de hLIGHT nativo o desnaturalizado, respectivamente).

Las tres preparaciones de anticuerpo policlonal anti-HLIGHT disponibles comercialmente (pAb de cabra de R&D, pAb de conejo de eBioscience y pAb de conejo de Preprotech) se unieron, cada uno, a las formas tanto nativa como desnaturalizadas de hLIGHT soluble. El pAb de cabra de R&D se une inmuno-específicamente a concentraciones ligeramente inferiores de hLIGHT soluble (límite inferior de detección: 0,04 ng de hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 0,13 ng de hLIGHT desnaturalizado). El pAb de conejo de eBioscience también se une inmuno-específicamente a concentraciones ligeramente inferiores de hLIGHT nativo (límite inferior de detección: 0,4 ng de hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 1,2 ng de hLIGHT desnaturalizado). De manera similar, el pAb de conejo de Preprotech también se unió inmuno-específicamente a concentraciones ligeramente inferiores de hLIGHT nativo (límite inferior de detección: 0,04 ng de hLIGHT nativo) que de hLIGHT desnaturalizado (límite inferior de detección: 0,13 ng de hLIGHT desnaturalizado).

Inhibición de la actividad biológica de células que expresan un receptor de hLIGHT. También se llevaron a cabo experimentos tal como se indica en el Ejemplo 1, con el fin de determinar si los anticuerpos monoclonales de ratón anti-HLIGHT disponibles comercialmente podían bloquear competitivamente la unión de hLIGHT soluble a RLTβ expresado sobre la superficie celular y HVEM sobre células HT29.14s. Se presentan los resultados en la figura 17 (CCL20) y en la figura 18 (RANTES) y demuestran que ni el mAb de ratón de R&D ni el mAb de ratón de Abnova eran capaces de inhibir la producción de las quimioquinas CCL20 o RANTES mediada por LIGHT por dichas células, mientras que los mAb humanos E13 y F23 sí fueron capaces de reducir la secreción de quimioquinas a niveles de fondo.

Ejemplo 3 – Caracterización de cadenas kappa de los anticuerpos humanos anti-HLIGHT F19 y E1

Se utilizaron los procedimientos comentados en el Ejemplo 1 para encontrar una pareja preferente de cadena kappa-cadena pesada de los anticuerpos producidos por los hibridomas de E1 y F19. Basándose en los resultados de estos experimentos, se demostró que E1kappa(B) (SEC ID nº 6) es la cadena ligera kappa preferente de los anticuerpos de hLIGHT producidos por el hibridoma de E1 y F19kappa(B) (SEC ID nº 9) es la cadena ligera kappa preferente de los anticuerpos de hLIGHT producidos por el hibridoma de F19.

Se generaron anticuerpos recombinantes de cadena kappa única mediante transfección transitoria de los vectores de expresión de mamífero que contenían los genes de cadena pesada emparejados con cada uno de los genes de cadena kappa individual que existen en las células de hibridoma parental. A continuación, este material se sometió a ensayo en paralelo con los anticuerpos purificados que se habían generado a partir de los hibridomas parentales respectivos.

Se llevaron a cabo ensayos de unión de anticuerpos tal como se indica en el Ejemplo 1. La pareja de cadena kappa-cadena pesada que comprendía E1kappa(B) o F19kappa(B) tiñó específicamente las líneas celulares establemente transfectadas con hLIGHT (HEK 293-HLIGHT) en un grado equivalente al de los anticuerpos respectivos producidos por el hibridoma parental (figura 19).

Se llevaron a cabo experimentos ELISA de bloqueo cruzado tal como se indica en el Ejemplo 1 y los resultados indican que estos anticuerpos recombinantes reconocen los mismos epítomos sobre hLIGHT que sus anticuerpos del hibridoma parental (figura 20).

Los anticuerpos recombinantes de cadena kappa única se sometieron a ensayo adicionalmente tal como se indica en el Ejemplo 1 para su capacidad de bloquear la unión de hLIGHT expresado en la superficie celular a formas de fusión de receptor soluble-Fc de tanto HVEM como RLTβ humanas (figura 21). Los niveles de bloqueo no fueron idénticos a los de los anticuerpos parentales.

Finalmente, se sometieron a ensayo los anticuerpos recombinantes de kappa única para su capacidad de inhibir la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales colónicas HT29, tal como se indica en los Ejemplos 1 y 2 (figura 22 y figura 23). En estos experimentos, la incubación de hLIGHT soluble con

anticuerpos anti-hLIGHT bloqueó la secreción mediada por hLIGHT de CCL20 a partir de células HT29.14s de manera similar a los hibridomas parentales.

Además, los recombinantes de cadena kappa única también mantuvieron la especificidad de los anticuerpos producidos por el hibridoma parental en la evaluación de transferencia por puntos de LIGHT nativo vs. Desnaturalizado (datos no mostrados).

Conjuntamente, estos resultados indican que E1kappa(B) (SEC ID nº 6) es la cadena ligera kappa preferente para la utilización en combinación con la cadena pesada de E1 (SEC ID nº 1) y F19kappa(B) (SEC ID nº 9) es la cadena ligera kappa preferente para la utilización en combinación con la cadena pesada de F19 (SEC ID nº 4).

Ejemplo 4 – Unión de anticuerpos y bloqueo mediado por anticuerpos de la unión de HVEM:Fc y RLTβ_Fc a variantes de polimorfismo de nucleótido único (SNP) de LIGHT

Existen por lo menos dos variantes de polimorfismo de nucleótido único (SNP) no sinónimas de la LIGHT humana (figura 24). Una variante SNP codifica un ácido glutámico (E) o una lisina (K) en la posición aminoácida 214, y la otra variante SNP codifica una serina (S) o una leucina (L) en la posición aminoácida 32. Tal como se muestra en las figuras 24A-24B, la frecuencia alélica de cada variante SNP en una diversidad de poblaciones étnicas varía. De esta manera, los anticuerpos de hLIGHT que se unen a una variante SNP dada pueden resultar más eficaces en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por hLIGHT, o síntoma de la misma, en dichas poblaciones étnicas con una incidencia más elevada de la variante SNP dada.

En el presente ejemplo, se demuestra que los anticuerpos de hLIGHT proporcionados en la presente memoria se unen a variantes SNP de hLIGHT no sinónimas que se encuentran presentes en los dominios extracelulares y citoplasmáticos de hLIGHT. La unión de dichos anticuerpos a las variantes SNP también se correlaciona con la capacidad del anticuerpo de bloquear eficazmente HVEM:Fc y RLTβ:Fc a la variante SNP de hLIGHT y también bloquea eficazmente la actividad biológicas de las células que expresan un receptor de hLIGHT.

Unión de anticuerpos. Se llevaron a cabo titulaciones de dosis de los anticuerpos F23 y E1kappa(B) tal como en el Ejemplo 1, con el fin de determinar si dichos anticuerpos se unían a variantes SNP de hLIGHT expresadas en la superficie celular. Se utilizó una línea celular EL4 en estos experimentos, que se preparó esencialmente tal como se indica en el Ejemplo 1, que expresó establemente sobre la superficie la variante SNP de hLIGHT respectiva. Tal como se muestra en las figuras 25A y 25C, respectivamente, cada uno de los anticuerpos F23 y E1kappa(B) se unió a ambas variantes SNP: 214E-32S y 214E-32L. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 25B, únicamente el anticuerpo F23, y no E1kappa(B), reconoció la variante SNP 214K-32S.

Los anticuerpos F23 (una IgG1), F19, E63 y E1kappa(B) también se sometieron a ensayo para determinar si existía una diferencia entre la capacidad de los “anticuerpos F” y los “anticuerpos E” de reconocer cualquiera de las formas de variante SNP. Tal como se muestra en la figura 26A y en la figura 26B, los anticuerpos F23 y F19 se unen a las formas SNP tanto 214E como 214K de hLIGHT. Sin embargo, los anticuerpos E63 y E1kappa(B) se unen únicamente a la forma predominante de LIGHT, 214E, y no a 214K (figuras 26A y 26B).

Actividad de bloqueo de los anticuerpos de la unión de HVEM:Fc y RLTβ:Fc a la variante SNP de LIGHT, 214K-32S. Debido a que el anticuerpo F23 se unía tanto a la forma predominante (214E) como a la forma menos predominante (214K) de variantes de LIGHT, a continuación se determinó si el anticuerpo F23 podía bloquear la unión de HVEM:Fc o de RLTβ_Fc. Se llevó a cabo el bloqueo mediado por anticuerpos de las proteínas de fusión de receptor tal como en el Ejemplo 1. Brevemente, se incubó la línea celular EL4-214K-32S con cantidades crecientes de anticuerpos anti-LIGHT seguido de la adición de HVEM:Fc o RLTβ:Fc. Se evaluaron los efectos de esta preincubación sobre la unión de los receptores mediante la detección de HVEM:Fc o de RLTβ:Fc y de la unión de RLTβ:Fc a la variante 214K-32S de LIGHT.

Inhibición de la actividad biológica mediada por la variante SNP de LIGHT de superficie celular de las células que expresan un receptor de LIGHT. El presente estudio se llevó a cabo para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos que previamente se había demostrado que se unían a ambas variantes SNP de hLIGHT, 214K y 214E, también eran capaces de bloquear eficazmente la secreción de RANTES en células epiteliales colónicas humanas, HT29.14s, que expresan tanto RLTβ como HVEM, por la variante SNP 214E o 214K de hLIGHT expresada sobre la superficie celular, o las variantes SNP de hLIGHT solubles de las mismas. En el ensayo de inducción de RANTES a partir de HT29.14s mediada por LIGHT expresado sobre la superficie celular, se preincubaron cantidades gradadas de anticuerpos anti-hLIGHT con un número constante de células que expresaban variantes SNP de hLIGHT (214K o 214E). Se sometieron a ensayo los niveles de quimioquinas el día 3 después del tratamiento y se compararon los niveles inducidos por hLIGHT soluble solo, por células que expresaban hLIGHT solo o por células preincubadas con IgG humana irrelevante a modo de proteína de control de isotipo.

En dichos ensayos, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria (F19 y F23) bloquearon hLIGHT soluble y ambas variantes SNP de hLIGHT expresadas sobre la superficie celular (214E y 214K) mediaron en la

inducción de RANTES de manera dependiente de la dosis. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-HLIGHT disponible comercialmente de R&D Systems (el mAb de ratón de R&D del Ejemplo 1) no pudo bloquear la secreción de quimioquinas mediada por hLIGHT expresado sobre la superficie celular o soluble, con independencia de la variante SNP. Tanto las variantes de hLIGHT expresadas sobre la superficie celular como los controles positivos de hLIGHT recombinante soluble indujeron niveles equivalentes de RANTES, y la preincubación de la IgG_h de isotipo de control negativo con variantes de hLIGHT expresado en la superficie celular o con hLIGHT recombinante soluble no redujo los niveles de RANTES significativamente.

Comentario. De los más de treinta polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el locus genómico de hLIGHT, existen por lo menos dos hLIGHT no sinónimos, con datos de frecuencias asociados a ellos (figura 24). Uno codifica un ácido glutámico (~0,9) o una lisina (0,1) en la posición aminoácida 214 de hLIGHT y reside en la región extracelular de hLIGHT. El otro codifica una serina (0,99) o una leucina (0,011) en el residuo aminoácido 32 y reside en la región citoplasmática de hLIGHT. El locus genómico de LIGHT₂ reside en una región cromosómica, ch19p13.3, que contiene un locus de susceptibilidad a la enfermedad intestinal inflamatoria (Rioux *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 66:1863-70, 2000) y sugiere de esta manera que un SNP podría estar correlacionado con la frecuencia de la enfermedad EII. Por lo tanto, resultaba interesante determinar si los anticuerpos anti-HLIGHT antagonistas proporcionados en la presente memoria eran capaces de reconocer variantes SNP no sinónimas de hLIGHT.

En el presente ejemplo, los presentes inventores sometieron a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-HLIGHT de unirse a variantes SNP de hLIGHT expresadas establemente sobre la superficie de las líneas de células EL4. Tal como se muestra en las figuras 25A y 25B, F23 se une a ambas variantes SNP, 214E y 214K, mientras que E1kappa(B9 se une únicamente a la forma predominante: 214E. De manera similar, F23 bloquea la unión de HVEM:Fc o RLTβ:Fc a estas células (figura 25D). Tal como se esperaba, el SNP citoplasmático aparentemente no afecta a la unión de ninguno de los anticuerpos (figura 25C). Al someter a ensayo los "anticuerpos E" y los "anticuerpos F", sólo los anticuerpos F fueron capaces de unirse a ambas variantes SNP, tanto 214K como 214E (figuras 26A y 26B). El anticuerpo mAb de ratón comercial de R&D también fue capaz de unirse a ambas variantes SNP (datos no mostrados).

Además del bloqueo de anticuerpo anti-HLIGHT de las versiones solubles de los receptores de variantes SNP de LIGHT *in vitro*, la inducción de quimioquinas mediada por SNP de hLIGHT de superficie celular también resultó inhibida por los anticuerpos anti-HLIGHT de la presente invención. En el presente ensayo, las líneas celulares EL4 que expresaban las variantes SNP de hLIGHT 214E o 214K se fijaron con formalina y se utilizaron para tratar la línea celular epitelial colónica HT29. Tal como se muestra en la figura 27, sólo estas líneas celulares indujeron niveles similares de RANTES a los inducidos por 1 µg de LIGHT soluble. Se sometieron a ensayo "anticuerpos F" anti-HLIGHT mediante la preincubación de línea expresantes de hLIGHT con cantidades gradadas de anticuerpo y se compararon con controles de isotipo o el mAb de ratón de R&D disponible comercialmente. Tanto F23 como F19kappa(B) inhibieron la secreción de RANTES mediada por cualquiera de las líneas celulares expresantes de variante SNP. Sin embargo, el mAb de ratón de R&D y el control negativo de isotipo humano no inhibieron la secreción de RANTES mediada por cualquiera de las variantes SNP de LIGHT. Ello a pesar del hecho de que el mAb de ratón de R&D pudo unirse a ambas variantes SNP. Estos resultados no sólo demuestran que los anticuerpos F23 y F19kappa(B) de la presente invención bloquean cualquier señalización por variantes SNP de LIGHT, sino que también se muestran superiores al mAb de ratón de R&D comercial.

Ejemplo 5 – Estudio de eficacia *in vivo* de 124F23 en el modelo de enfermedad aguda de injerto xenogénico contra huésped

En el presente ejemplo, se evaluó la eficacia *in vivo* de un anticuerpo anti-HLIGHT proporcionado en la presente memoria en un modelo de enfermedad murina aguda de injerto xenogénico-contra-huésped (EICH). Se demostró que el anticuerpo F23 en este modelo reducía la patología macroscópica global (diarrea, inflamación peritoneal y ascites, y la inflamación intestinal) y la histopatología (severidad de la inflamación, extensión de la inflamación, daño/atrofia de las vellosidades y porcentaje de afectación), así como reducía el número de células T en el bazo.

Purificación de PBMC humanas a partir de sangre completa. Se recolectó sangre completa de donantes sanos de edades comprendidas entre los 18 y los 50 años a través del programa habitual de donantes de sangre del Scripps Green Hospital (La Jolla, CA) y se añadió heparina para evitar la coagulación. No se especificó la raza, etnicidad o género. La sangre fue diluida en PBS y después se aplicó una capa subyacente de Ficoll-Plaque Plus (Amersham Biosciences). Se separaron las células mononucleares del suero y las plaquetas mediante centrifugación a 1.800 rpm sin freno. A continuación, se recolectó la interfaz que contenía las PBMC y se lavaron dos veces con PBS.

Modelo *in vivo* de enfermedad aguda del injerto contra el huésped: se utilizó un modelo de enfermedad aguda de injerto xenogénico contra el huésped para someter a ensayo el potencial terapéutico del anticuerpo humano anti-HLIGHT humano de F23 (124F23G1) *in vivo* (Watanabe *et al.*, Clin. Immunol. 120:247-59, 2006), esencialmente tal como se indica de manera general en la figura 28. Brevemente, en ratones macho con inmunodeficiencia

combinada grave (SCID) de edades comprendidas entre las 5 y 10 semanas, el día -2 se inyectaron 20 µg de anticuerpo de rata anti-cadena beta de receptor de IL-2 de ratón (IL2Rβ) (TMβ, Tanaka *et al.*, J. Exp. Med. 178:1103, 1993) para reducir el número de células asesinas naturales murinas endógenas. Al día siguiente (día -1), los ratones recibieron 2,5 Gy de irradiación subletal utilizando una fuente de cesio para permitir la migración de las células humanas al tracto intestinal. Al día siguiente (día 0), los ratones recibieron 10 millones de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas totales en PBS mediante inyección intraperitoneal seguida inmediatamente por la inyección intravenosa de anticuerpo humano anti-LIGHT humano (124F23G1) o IgG1_h de control negativo (anti-dinitrofenol (anti-DNP), Kirin Brewery Co., Ltd.) a una dosis de 100 µg en 100 µl de PBS. Las células T humanas se expanden e inducen una enfermedad de tipo injerto contra el huésped y síntomas de la misma, resultando en, por ejemplo, pérdida de peso, hematuria, hidroperitoneo, infiltrados de células inflamatorias en el hígado y en el tracto intestinal, y finalmente, la muerte. La enfermedad está mediada principalmente por células T humanas, ya que la transferencia de células T solamente induce síntomas similares. Se determinó el peso corporal cada 3-4 días y los ratones recibieron el anticuerpo anti-IL2Rβ semanalmente. El día 12 los ratones fueron sacrificados y se analizaron para la patología macroscópica y síntomas de la enfermedad; se recolectaron los bazo para el análisis de citometría de flujo y los ciegos para la histología y se recolectó suero para el análisis de citocinas y anticuerpos humanos (Watanabe, Clin. Immunol. 120:247-59, 2006).

Análisis funcional *in vivo* de anticuerpos monoclonales humanos anti-LIGHT humano. La patología macroscópica observada el día 12 se puntuó de la manera siguiente: diarrea (0 o 1), hemorragias en el intestino y cavidad peritoneal y peritonitis (cada uno puntuado como 0, 1, 2 o 3, según si nulo, leve, moderado o grave, respectivamente). Se utilizó la suma de todos los síntomas de enfermedad para determinar la puntuación total de patología macroscópica. Tal como se muestra en la figura 29, los ratones que recibieron el anticuerpo de control o PBMC solas (sin inyección de anticuerpo) mostraron todos síntomas de EICH, con puntuaciones de patología superiores a las de ratones que habían recibido el anticuerpo anti-LIGHT 124F23G1.

Se llevó a cabo un análisis histopatológico de las secciones H+E del ciego y se puntuaron de la manera siguiente: gravedad de la inflamación, extensión de la inflamación, daño/atrofia de las vellosidades y porcentaje de afectación (cada uno puntuado como 0, 1, 2 o 3 según si nulo, leve, moderado o grave, respectivamente). La puntuación final era la suma de cada categoría, con una puntuación máxima de 12 para cada ratón. Tal como se muestra en la figura 30, los ratones que habían recibido el anticuerpo de control o sólo PBMC (sin inyección de anticuerpo) presentaron histopatología similar, mientras que los ratones que habían recibido inyección de 124F23G1 no mostraron signos histológicos de la enfermedad. Un ejemplo de la histología del ciego observado en los animales tratados con anti-LIGHT se ilustra en la figura 31A, que muestra una estructura uniforme de las vellosidades, de la submucosa y de la capa muscular, así como una ausencia de ascites o sangre. En contraste, la histología del ciego de un animal tratado con anticuerpo de control presentaba signos prominentes de enfermedad, incluyendo una submucosa llena de ascites, signos de sangrado intestinal, indicado por agrupaciones de eritrocitos e infiltrados prominentes de linfocitos (figura 31B).

Los análisis de los bazo concordaron con la patología macroscópica y la histopatología. Se encontraban presentes células T humanas en los bazo de los ratones tratados con los anticuerpos de control pero el número de células T humanas en los animales tratados con 124F23G1 eran significativamente inferiores a los números de células T en los animales de control (figura 32).

En los estudios de seguimiento, puede utilizarse tanto la versión reductora de células T (IgG1) y/o la no reductora de células T (IgG4PE) de los anticuerpos anti-HLIGHT para evaluar el mecanismo de mejora de la enfermedad, tal como si las células T están siendo bloqueadas por el anticuerpo o por el contrario están experimentando apoptosis.

Comentario: la enfermedad aguda del injerto contra el huésped (EICH) es una complicación mayor asociada al trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. La EICH se define de manera general como un ataque amplio contra los tejidos del huésped por parte de las células T del donante. Tras el trasplante, la inmunosupresión sistémica es el método actual para prevenir la EICH; sin embargo, ello puede conducir a infecciones de patógenos oportunistas y la recaída de la leucemia. Por lo tanto, el bloqueo de las señales coestimuladoras de las células T es una de las alternativas más prometedoras a los inmunosupresores. Los últimos informes indican que la coestimulación de LIGHT-HVEM de las células T desempeña un papel patogénico crucial en la EICH (Xu *et al.*, 109:4097-4104, 2007). De esta manera, los anticuerpos anti-LIGHT antagonistas podrían poseer eficacia terapéutica para la EICH. La eficacia *in vivo* en el modelo de EICH xenogénico agudo demuestra este potencial.

Modelo xenogénico agudo de EICH en el que se inyectan PBMC humanas en ratones SCID irradiados subletalmente con reducción del número de células NK (figura 28). En este modelo, la irradiación inicia el daño intestinal y las células T median en la inflamación intestinal de la enfermedad. Los animales muestran signos graves de la enfermedad aproximadamente 12 días después de la inyección de las PBMC. Entre los signos característicos de la enfermedad se incluyen la inflamación intestinal que se manifiesta en hemorragias, ascites y atrofia de las vellosidades. En un estudio inicial, el tratamiento de los ratones con 100 microgramos de anticuerpo

anti-LIGHT (124F23G1) redujo la patología macroscópica observada en el intestino (figura 29). De manera similar, esta reducción resultó corroborada por un análisis más fino de la histopatología del ciego, en el que el tratamiento de anticuerpos anti-LIGHT no condujo a enfermedad detectable (figura 30). La figura 31A muestra una sección representativa teñida con H+E del ciego de un animal tratado con anti-LIGHT. En contraste, el ciego de un animal tratado con anticuerpo de control muestra signos característicos de inflamación grave del intestino, incluyendo manchas rojas de células indicativas de hemorragia, líquido extremadamente internalizado llenando la submucosa e infiltrados de linfocitos (figura 31B). En este modelo, las células T humanas transferidas son las principales responsables de la inducción de la enfermedad y el número de células T esplénicas tiende a correlacionarse con la gravedad de la enfermedad. El tratamiento con anticuerpo anti-LIGHT reduce significativamente el número total de células T humanas en el bazo (figura 32). De esta manera, conjuntamente, estos datos indican que los anticuerpos anti-LIGHT muestran eficacia *in vivo* en este modelo, reduciendo significativamente los signos de enfermedad respecto al control negativo.

Ejemplo 6 – Análisis cristalográfico de rayos X de una interacción de LIGHT humano / anticuerpo anti-LIGHT humano (F23)

Se utilizó el anticuerpo F23G1 (o fragmento Fab del mismo) para evaluar la naturaleza del reconocimiento preferente de hLIGHT trimérico nativo. El análisis estructural permitió la identificación de residuos aminoácidos de contacto específicos entre el anticuerpo anti-hLIGHT y la molécula de hLIGHT para definir adicionalmente el epítipo conformacional reconocido por el anticuerpo. La cristalización de complejos de LIGHT-Fab anti-LIGHT se llevó a cabo mediante métodos estándares de difusión de vapor de gota sedente (ver, por ejemplo, McRee, en: Practical Protein Crystallography (Academic Press, San Diego, CA), páginas 1 a 23, 1993; Rhodes, en: Crystallography Made Crystal Clear (Academic Press, San Diego, CA), 29-38, páginas 8 a 10, 1993). Los cristales se analizaron utilizando un SYNCHROTRON y los datos se analizaron utilizando el paquete de programas CCP4 (Science & Technology Facilities Council, Computational Science and Engineering Department), que es una colección de diferentes programas que cubren la mayoría de los cálculos necesarios para la cristalografía macromolecular. Tal como apreciará el experto en la materia, pueden utilizarse de manera similar otros anticuerpos de hLIGHT proporcionados en la presente memoria para determinar la unión de epítopos de hLIGHT y los residuos aminoácidos de contacto.

Ejemplo 7 – Estudio de eficacia *in vivo* de 124F23 en el modelo de enfermedad colitis

Modelo de colitis de transferencia de células T humanas. De manera análoga al modelo de transferencia de CD4⁺/CD45Rbhi de colitis en el ratón descrito en Morrissey *et al.*, J. Exp. Med. 178:237, 1993, se inyectaron células T no expuestas humanas (CD45RA+CD45RO-) en ratones RAG-/- . En este modelo, una cepa transgénica de HLA (C57BL/6NTac-[KO]Abb-[Tg]DR-4) compatible con el tipo de HLA de un donante humano se retrocruzó con un fondo RAG-/- ((B6.129S6-Rag2^{tm1Fwa}N12) para permitir la presentación de antígenos entre las APC de los ratones receptores y las células T donantes humanas. Esta interacción resulta necesaria para el reconocimiento de las células T de la microflora intestinal, que se cree que es responsable de la activación y retorno de las células T al intestino. Los animales experimentaron pérdida de peso y caquexia, junto con inflamación intestinal, que no se observó en los ratones RAG-/- .

En determinados grupos, se administra un anticuerpo humano anti-hLIGHT (por ejemplo, F23) a una dosis de 100 µg (o, por ejemplo, comprendida entre 2 µg y 500 µg) por cada animal mediante inyección intravenosa simultáneamente con la administración de células T donantes humanas. En determinados grupos, el anticuerpo anti-hLIGHT se administra en diversos intervalos de tiempo antes y/o después de la administración de células T donantes humanas. Debido a que los anticuerpos anti-LIGHT se unen a LIGHT expresado sobre la superficie de las células T activadas, se previenen y/o tratan los síntomas de la enfermedad. En los estudios de seguimiento, pueden utilizarse versiones tanto reductoras del número de células T (IgG1) y/o no reductoras (IgG4PE) de los anticuerpos anti-hLIGHT para evaluar el mecanismo de mejora de la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos IgG4 anti-LIGHT son capaces de bloquear la coestimulación y supervivencia de las células T.

Ejemplo 8 – Modelo de EII de enfermedad humana en ratones con activación (“knock in”) de LIGHT humano

Tal como se comenta en otros sitios en la presente memoria, se ha relacionado anteriormente LIGHT con la patología de la enfermedad EII (ver, por ejemplo, Wang *et al.*, J. Immunol. 174:8173-82, 2005; Wang *et al.*, J. Clin. Invest. 113:826-35, 2004; Cohavy *et al.*, J. Immunol. 174:646-53, 2005). En el presente ejemplo, se creó un modelo de EII de ratón de activación de hLIGHT y se administraron anticuerpos monoclonales humanos anti-hLIGHT en el animal para evaluar la eficacia *in vivo* de estos anticuerpos en el tratamiento de la EII. Debido a que se ha demostrado que dichos anticuerpos bloquean la unión de receptores a hLIGHT, bloqueando la actividad biológica de hLIGHT (ver, por ejemplo, los Ejemplos 1 a 4) y el tratamiento de la EICH (Ejemplo 5), se espera que los anticuerpos de hLIGHT de la invención también resulten eficaces en el tratamiento de la EII.

Generación de activación ("knock in") de LIGHT. Se generaron ratones con alteración del gen de LIGHT de ratón que también presentaban una inserción dirigida del gen de LIGHT humano, utilizando métodos estándares de inserción génica dirigida mediante recombinación homóloga. Brevemente, se produjeron células ES de ratón dirigida a gen mediante electroporación de un constructo de inserción dirigida de genes en células ES de tipo salvaje. La recombinación homóloga entre el genoma de la célula ES y dos regiones de homología en el vector de inserción dirigida que flanquean el gen de LIGHT humano resultan en la sustitución del gen de LIGHT de ratón por el gen de LIGHT humano. A continuación, se implantó un blastocisto en hembras pseudogestantes, conduciendo a la generación de ratones híbridos. La cría produjo los animales con activación de LIGHT homólogo.

Modelos de EII de enfermedad humana. Se utilizaron los animales con activación de hLIGHT en modelos establecidos de EII. Un modelo establecido de EII incluye la administración de dextrán sulfato sódico (DSS) en agua de boca (ver, por ejemplo, Mähler *et al.*, Am. J. Physiol. 274G544-51, 1998). Brevemente, se indujo colitis experimental mediante la administración de DDS al 3,5% (p/v) (p.m. de 36.100-45.000; TbD Consultancy, Uppsala, Suecia) en agua de boca acidificada ad libitum durante 5 días. A continuación, se detuvo la administración de DDS y los ratones recibieron agua de boca acidificada sola durante 16 días, hasta la necropsia el día 21. Esta dosis induce colitis moderada a grave, minimizando la mortalidad, aunque pueden utilizarse otras dosis. A continuación, se recogió el intestino grueso y se separó el ciego del colon. Seguidamente se llevó a cabo la fijación estándar de los tejidos y la tinción con H+E para determinar la severidad de la inflamación y las lesiones. Los ratones fueron evaluados para patología, histopatología, síndrome caquéctico y/o muerte.

Un segundo modelo establecido de EII incluye la administración rectal de ácido trinitrobenzeno-sulfónico (TNBS) (ver, por ejemplo, Neurath, J. Exp. Med. 182:1281-90, 1995). Brevemente, para inducir colitis, los ratones son brevemente anestesiados con metorfano y seguidamente se inserta cuidadosamente un catéter 3.5F en el colon, de manera que la punta se encuentra aproximadamente a 4 cm del ano. Para inducir la colitis, se introducen 0,5 mg de reactivo hapteno TNBS (Sigma, St. Louis, MO) en etanol al 50% (para romper la barrera intestinal) en el lumen del colon por el catéter fijado a una jeringa de 1 ml. En experimentos de control, los ratones recibieron etanol al 50% únicamente. El volumen total de inyección fue de 100 µl en ambos grupos, permitiendo que el TNBS o el etanol alcanzase a todo el colon, incluyendo el ciego y el apéndice. A continuación, los animales se mantuvieron en posición vertical durante 30 segundos y se devolvieron a sus jaulas, o el modelo de transferencia de CD4⁺/CD45Rbhi de colitis en el ratón (ver, por ejemplo, Morrissey *et al.*, J. Exp. Med. 178:237-44, 1993). Seguidamente pueden utilizarse anticuerpos anti-LIGHT para el tratamiento y la prevención de la enfermedad establecida, tal como en dosis de 2 a 500 µg en cada animal, esencialmente tal como se ha indicado anteriormente. Seguidamente se recoge el intestino grueso y se separa el ciego del colon. En diversos puntos temporales posteriores, se extrae el intestino y después se lleva a cabo una fijación estándar de los tejidos y tinción con H+E, para determinar la gravedad de la inflamación y las lesiones. Los ratones fueron evaluados para patología, histopatología, síndrome caquéctico y/o muerte.

Un tercer modelo establecido de EII es el modelo de transferencia de CD4⁺/CD45RBhi de colitis en el ratón (ver, por ejemplo, Morrissey *et al.*, J. Exp. Med. 178:237-44, 1993). Brevemente, células T de ganglio linfático CD4⁺ purificadas fueron separadas según su expresión de CD45RB e inyectadas en ratones con activación de hLIGHT. A continuación, se llevó a cabo fijación estándar de los tejidos y tinción con H+E para determinar la gravedad de la inflamación y las lesiones. Los ratones fueron evaluados para patología, histopatología, síndrome caquéctico y/o muerte.

Los anticuerpos anti-LIGHT (por ejemplo, dosis de 2 a 500 µg por cada animal) pueden utilizarse con cualquier modelo de EII, tal como los indicados anteriormente, para evaluar la eficacia en el tratamiento y la prevención de la EII, esencialmente tal como se ha indicado anteriormente. Debido a que se ha demostrado anteriormente que estos anticuerpos bloquean la unión de receptores de hLIGHT, bloquean la actividad biológica de hLIGHT (ver, por ejemplo, los Ejemplos 1 a 4), tratando la EICH (Ejemplo 5), se espera que los anticuerpos de hLIGHT de la invención también resulten eficaces en el tratamiento de la EII.

Las formas de realización de la presente invención indicadas anteriormente son proporcionadas únicamente a título de ejemplo y el experto en la materia reconocerá, o podrá determinar utilizando nada más que experimentación rutinaria, numerosos equivalentes de los procedimientos específicos descritos en la presente memoria. La totalidad de dichos equivalentes se considera que se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención y se encuentran cubiertos por las reivindicaciones a continuación. Además, tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen las formas plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una mezcla de dos o más de dichos anticuerpos, y similares. Además, el experto ordinario en la materia reconocerá que las secuencias de operaciones deben indicarse en algún orden específico con el propósito de explicación y reivindicación, aunque la presente exposición contempla diversos cambios más allá de dicho orden específico.

Otras formas de realización se encuentran comprendidas dentro de las reivindicaciones a continuación.

Listado de secuencias

5 <110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.
 La Jolla Institute for Allergy & Immunology
 <120> Anticuerpos monoclonales humanos específicos de hLIGHT antagonistas
 <130> 7505-049-228
 10 <140>
 <141>
 <150> 60/840,774
 <151> 2006-08-28
 15 <150> 60/897,875
 <151> 2007-01-25
 <160> 106
 20 <170> FastSEQ for Windows versión 4.0
 <210> 1
 <211> 136
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de E1
 30 <400> 1
 Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Arg Phe Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ile Ala Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 2
 <211> 138
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de E13
 40 <400> 2
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20							25					30				
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	
35			40				45									
Ser	Asn	Ala	Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
50			55				60									
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Lys	Ser	Lys	Ile	Asp	Gly	Gly	Thr	Thr	Asp	
65			70				75			80						
Tyr	Ala	Ala	Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	
			85				90			95						
Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	
			100				105			110						
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Thr	Ala	Met	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	Trp	
115			120				125									
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
130			135													

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> Región variable de cadena pesada de E63

$\langle 400 \rangle$ 3

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Val
		35					40					45			
Ser	Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
	50					55					60				
Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
65					70					75				80	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys
				85					90					95	
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala
			100					105					110		
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Ile	Thr	Met	Phe	Arg	Gly	Val	Gly	Phe
		115					120					125			
Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
	130					135					140				

<210> 4

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<223> Región variable de cadena pesada de F19

<400> 4

Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys
			20					25					30		
Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe
		35					40					45			
Ser	Gly	Tyr	Asn	Trp	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55				60					
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Thr	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro
65					70					75					80

```

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      85          90          95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      100          105          110
Tyr Cys Val Arg Glu Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Gly Met
      115          120          125
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130          135          140

```

<210> 5

<211> 143

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de F23

<400> 5

```

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1      5      10      15
Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln
      20      25      30
Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
      35      40      45
Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg
      50      55      60
Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Gln Tyr
65      70      75      80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
      85      90      95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
      100      105      110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Ala Thr Ala Asp Lys Gly Tyr Tyr
      115      120      125
Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130      135      140

```

<210> 6

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> región variable nº 2 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(B))

<400> 6

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1      5      10      15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
      20      25      30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
      35      40      45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
      50      55      60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65      70      75      80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
      85      90      95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
      100      105      110
Gly Ser Ser Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      115      120      125

```

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Región variable de cadena ligera kappa de E13

<400> 7

Met	Glu	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5				10					15		
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser
			20					25				30			
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
		35					40					45			
Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala
	50					55					60				
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro
65					70					75					80
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				85				90						95	
Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr
			100					105					110		
Gly	Ser	Ser	Pro	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
			115				120					125			
Lys	Arg														
	130														

5

<210> 8

<211> 126

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Región variable de cadena ligera kappa de E63

15

<400> 8

Met	Ser	Pro	Ser	Gln	Leu	Ile	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	Ala
1				5				10					15		
Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val
			20					25				30			
Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile
		35				40						45			
Gly	Ser	Ser	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys
	50					55				60					
Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
65					70				75						80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser
				85				90						95	
Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Ser
			100					105					110		
Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			115				120					125			

<210> 9

<211> 129

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Región variable de cadena ligera kappa de F19 nº 2

25

<400> 9

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1      5      10      15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20      25      30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35      40      45
Arg Gly Ile Asn Ser Ala Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50      55      60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65      70      75      80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85      90      95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100      105      110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115      120      125
Lys

```

<210> 10

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Región variable de cadena ligera kappa de F23

<400> 10

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1      5      10      15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20      25      30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35      40      45
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50      55      60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65      70      75      80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85      90      95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100      105      110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115      120      125
Lys

```

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de E1

<400> 11

```

Arg Phe Asn Met Asn
 1      5

```

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de E1

<400> 12
 Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de E1

<400> 13
 Ser Ile Ala Ala Phe Asp Tyr
 1 5

15 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de E13

<400> 14
 Asn Ala Trp Met Ser
 1 5

25 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de E13

<400> 15
 Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

35 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de E13

45 <400> 16
 Ala Met Ala Gly Ala Phe Gly Phe
 1 5

50 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de E63

<400> 17
 Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de E63
 <400> 18
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 10 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de E63
 20 <400> 19
 Trp Ile Thr Met Phe Arg Gly Val Gly Phe Asp Pro
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR1 de la región variable nº 2 de cadena pesada de F19 (F19 kappa(B))
 30 <400> 20
 Gly Tyr Asn Trp His
 1 5
 <210> 21
 35 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 40 <223> CDR2 de la región variable nº 2 de cadena pesada de F19 (F19 kappa(B))
 <400> 21
 Glu Ile Thr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 45 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> CDR3 de la región variable nº 2 de cadena pesada de F19 (F19 kappa(B))
 <400> 22
 Glu Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 55
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <220>

<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada de F23

<400> 23
 Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

5 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena pesada de F23

<400> 24
 Glu Ile Asn Gln Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10

15 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena pesada de F23

25 <400> 25
 Glu Ile Ala ~~Pro~~ Ala Asp Lys Gly Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 Thr 5 10

30 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <223> CDR1 de la región variable nº 2 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(B))

<400> 26
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10

40 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera de E1 nº 2 (E1 kappa(B))

<400> 27
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

50 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <223> CDR3 de la región variable nº 2 de la cadena ligera de E1 (E1 kappa(B))

<400> 28
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met Tyr Thr
 1 5

60

<210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de cadena ligera de E13
 <400> 29
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 10 1 5 10
 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de E13
 20 <400> 30
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena ligera de E13
 30 <400> 31
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
 1 5 10
 <210> 32
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 40 <223> CDR1 de la región variable de cadena ligera de E63
 <400> 32
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
 1 5 10
 45 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de E63
 <400> 33
 Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
 1 5
 55 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <220>

<223> CDR3 de la región variable de cadena ligera de E63

<400> 34
His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

5
 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <220>
 <223> CDR1 de la región variable nº 2 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(B))

<400> 35
Arg Ala Ser Arg Gly Ile Asn Ser Ala Phe Ala
1 5 10

15
 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable nº 2 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(B))

25
 <400> 36
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

30
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <220>
 <223> CDR3 de la región variable nº 2 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(B))

<400> 37
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

40
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45
 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de cadena ligera de F23

<400> 38
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

50
 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55
 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena ligera de F23

<400> 39
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

60

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena ligera de F23

<400> 40
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

10

<210> 41
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <223> ADNc de la región variable de cadena pesada de E1

20

<400> 41
 atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctattt tagaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg ggggggccct gagactctcc 120

 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaga ttttaacatga actgggtccg ccaggctcca 180
 ggggaaggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagta gttataccat atactacgca 240
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actggatctg 300
 caaatgaaca gcctgagaga cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag gagtatagca 360
 gcagcttttg actactgggg ccaggggagcc ctggtcaccg tctctctca 408

25

<210> 42
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <223> ADNc de la región variable de cadena pesada de E13

<400> 42
 atggagtttg ggctgagctg gatatttcctt gctgcgattt taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtaaagcctg ggggggccct tagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tctcagtaac gcctggatga gctgggtccg ccaggctcca 180
 ggggaaggggc tggagtgggt ttgccgtatt aaaagcaaaa tagatggtgg gacaacagac 240
 tacgctgcac ccgtgaaagg cagattcacc atctcaagag atgattcaaa aaacacgctg 300
 tttctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacagccg tgtattactg taccacagca 360
 atggctggtg cgtttggett ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 414

35

<210> 43
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <223> ADNc de la región variable de cadena pesada de E63

<400> 43
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtccgg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
 tgcattgtct ctggtggctc cgtcagcagt ggtggttact actggagctg gatccggcag 180
 ccccaggga agggactgga gtggattggg tatatctatt acagtgggag caccaactac 240
 aaccctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac cgctgcggac acggccgtgt attactgtgc gagatggatt 360
 actatgttcc ggggagttgg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
 tca 423

45

<210> 44
 <211> 423

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> ADNc de la región variable de cadena pesada de F19

<400> 44

```
atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggg tacaactggc actggatccg ccagccccc 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc actcatagtg gaagcaccaa ttacaacc 240
tcctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtgtattact gtgtgcgaga gattgcagt 360
gctggtacgg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggc caccgtctcc 420
tca 423
```

10 <210> 45

<211> 429

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> ADNc de la región variable de cadena pesada de F23

<400> 45

```
atggacctcc tgcacaagaa catgaaacac ctgtggttct tcctcctcct ggtggcagct 60
cccagatggg tcctgtccca ggtgcagcta cagcagtggg gcgcaggact gttgaagcct 120
tcggagaccc tgtccctcac ctgcgctgtc tatggtgggt ccttcagtgg ttactactgg 180
aactggatcc gccagcccc agggaagggg ctggagtgga ttggggaaat caatcagtac 240
aaccgctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagata 360
gcaacagctg ataaagggtg ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420
gtctctctca 429
```

20 <210> 46

<211> 384

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25 <220>

<223> ADNc de la región variable nº 2 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(B))

<400> 46

```
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtcg agtggttagc agcagctact taacctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaatgta cacttttggc 360
caggggacca agctggagat caaa 384
```

30 <210> 47

<211> 390

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E13

40 <400> 47

```
atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtcg agtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccat gtacactttt 360
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga 390
```

<210> 48
<211> 378
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<220>
<223> ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de E63

<400> 48
atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
attgtgctga ctgagctctc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
cagtcctcaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
ttcagtgcca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
gatgctgcag catattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa 378

10

<210> 49
<211> 387
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15

<220>
<223> ADNc de la región variable nº 2 de cadena ligera kappa de F19 (F19 kappa(B))

<400> 49
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggtttctgc tgcctctggc cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtcctca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcggggc attaacagtg cttttgcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagtccttaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtgggggc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc tctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 378

25

<210> 50
<211> 387
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ADNc de la región variable de cadena ligera kappa de F23

30

<400> 50
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggtttctgc tgcctctggc cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtcctca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagt ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagtccttaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtgggggc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 378

35

<210> 51
<211> 723
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de hLIGHT

40

<400> 51
atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgagggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
ggtctcttgc tgttgctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggctggtt cctcctgcag 180
ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgcctgcctg acggacctgc aggtcctctg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360
gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggcccttg tggtcaccaa agctggctac 420
tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgctggg cctggccagc 480
accatcacc acggcctcta caagcgaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggacgggcc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600
agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggagg aggtggtcgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggtctt acttcggggc tttcatggtg 720
tga 723

<210> 52
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hLIGHT de longitud completa

<400> 52
Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln

1	5	10	15
Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser			
20	25	30	
Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Gly			
35	40	45	
Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg			
50	55	60	
Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp			
65	70	75	80
Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala			
85	90	95	
His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu			
100	105	110	
Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr			
115	120	125	
His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr			
130	135	140	
Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser			
145	150	155	160
Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu			
165	170	175	
Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser			
180	185	190	
Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His			
195	200	205	
Leu Glu Ala Gly Glu Glu Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu			
210	215	220	
Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val			
225	230	235	240

<210> 53
<211> 630
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hLIGHT soluble marcado con FLAG (240 aa)


```

<400> 53
atgcctggga agatggctgt gatccttgga gcctcaaata tactttggat aatgtttgca 60
gcttctcaag ctgactacaa ggacgacgat gacaagtacg taggagagat ggtcacccgc 120
ctgcctgacg gacctgcagg ctccctggag cagctgatac aagagcgaag gtctcacgag 180
gtcaaccag cagcgcctc cacaggggcc aactccagct tgaccggcag cggggggccg 240
ctgttatggg agactcagct gggcctggcc ttccctgagg gcctcagcta ccacgatggg 300
gcccttgtgg tcaccaaagc tggctactac tacatctact ccaaggtgca gctgggagg 360
gtgggctgcc cgctgggcct ggccagcacc atcaccacag gcctctacaa gcgcacaccc 420
cgctaccccg aggagctgga gctgttggtc agccagcagt caccctgcgg acggggccacc 480
agcagctccc gggctctggtg ggacagcagc ttccctgggtg gtgtggtaca cctggaggct 540
ggggaggagg tggctcgtccg tgtgtggat gaacgcctgg ttcgactgag tgatggtacc 600
cggtcttact tcggggcctt catggtgtga 630

```

```

<210> 54
<211> 183
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<223> hLIGHT soluble marcado con FLAG (183 aa)

```

```

<400> 54
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro
1      5      10      15
Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser
20     25     30

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

```

```

<210> 55
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> cebador RACEUPS5'

```

```

<400> 55
ctaatacgac tcactatagg gc      22

```

```

<210> 56
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> cebador IgG1p

```

<400> 56
 tctgtccac ctggtgttg ctgggcttgt g 31

 5 <210> 57
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> cebador HK5

 <400> 57
 aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc 30

 15 <210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador M13F

 <400> 58
 gtaaaacgac ggccagtg 18
 25
 <210> 59
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador M13R

 <400> 59
 caggaaacag ctatgac 17
 35
 <210> 60
 <211> 41
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador E63HF85

 45 <400> 60
 agagagagag gtcgaccacc atgaaacacc tgtggttctt c 41

 <210> 61
 <211> 37
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador E63HR38
 55
 <400> 61
 gagagagaga gctagctgag gagacggtga ccagggt 37

 <210> 62
 60 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> cebador E63LF84

<400> 62
 agagagagag atctctcacc atgtcgccat cacaactcat tg 42

5 <210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador E63LR43

<400> 63
 agagagagag cgtacgttg atctccacct tggccctcc 40

15 <210> 64
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador HH-2

<400> 64
 gctggagggc acggtcacca cgctg 25

25 <210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador HK-2

<400> 65
 gttgaagctc ttgtgacgg gcgagc 26

35 <210> 66
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador F23HF86

45 <400> 66
 agagagagag gtcgaccacc atggacctcc tgcacaagaa c 41

<210> 67
 <211> 34
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador F23HR55

55 <400> 67
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgt 34

<210> 68
 60 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> cebador F23LF36

<400> 68
 agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tc 42

5 <210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador F23LR43

<400> 69
 agagagagag cgtacgttg atctccacct tggccctcc 40

15 <210> 70
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador E1HFSall

25 <400> 70
 agagagagag gtcgaccacc atggagttgg ggctgtgctg g 41

<210> 71
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador E1HRNhel

35 <400> 71
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggc 37

<210> 72
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador F19HFSall

45 <400> 72
 agagagagag gtcgaccacc atgaacacc tgtggtctt c 41

<210> 73
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador F19HRNhel

55 <400> 73
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt 37

<210> 74
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador E1KF2+3BgIII

65

<400> 74
 agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc 42

 <210> 75
 5 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> cebador E1KR2BsiWI

 <400> 75
 agagagagag cgtacgttg atctccagct tggcccctg 40

 15 <210> 76
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador E1KR3BsiWI

 <400> 76
 25 agagagagag cgtacgttg attccacct tggcccctg 40

 <210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> cebador F19KR1+2BsiWI

 <400> 77
 35 agagagagag cgtacgttg atctccacct tggcccctc 40

 <210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador F19KR3BsiWI

 45 <400> 78
 agagagagag cgtacgttg atctccagct tggcccctg 40

 <210> 79
 <211> 42
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador F19KF1+2+3BgII

 55 <400> 79
 agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tc 42

 <210> 80
 60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> cebador directo

<400> 80
gtaggagaga tggcaccgc cct 23

<210> 81
5 <211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador inverso

<400> 81
ggaacgcgaa ttcccacgtg tcagacccat gtccaat 37

15 <210> 82
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<223> región variable nº 1 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(A))

<400> 82
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Phe Asn Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Ala Arg Gly Pro Ser Trp Arg Ser
115 120 125

25 <210> 83
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de ADNc de región variable nº 3 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(C))

<400> 83
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110
Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

35 <210> 84
<211> 11
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<223> CDR1 de la región variable nº 1 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(A))

5 <400> 84
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 85
10 <211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
15 <223> CDR1 de la región variable nº 3 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(C))

<400> 85
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

20 <210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <220>
<223> CDR2 de la región variable nº 1 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(A))

<400> 86
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

30 <210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<223> CDR2 de la región variable nº 3 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(C))

<400> 87
Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
40 **1 5**

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
45 <213> Homo sapiens

<220>
<223> CDR3 de la región variable nº 1 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(A))

50 <400> 88
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Arg Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
55 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> CDR3 de la región variable nº 3 de cadena ligera de E1 (E1 kappa(C))

60

<400> 89
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 10 <223> Región variable nº 1 de cadena ligera kappa de F19 (F19 kappa(A))

<400> 90
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg
 100 105 110
 Thr Tyr Asn Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 Lys

15 <210> 91
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <220>
 <223> Región variable nº 3 de cadena ligera kappa de F19 (F19 kappa(C))

<400> 91
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys

25 <210> 92
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable nº 4 de cadena ligera kappa de F19 (F19 kappa(D))

<400> 92

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5				10					15		
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25					30		
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly
		35					40					45			
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
	50					55					60				
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala
65					70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
			85					90						95	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser
			100					105					110		
Asn	Trp	His	Pro	Val	Arg	Pro	Arg	Asp	Gln	Gly	Gly	Asp	Ser		
		115					120					125			

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> CDR1 de la región variable nº 1 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(A))

<400> 93

Arg	Val	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> CDR1 de la región variable nº 3 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(C))

<400> 94

Arg	Met	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> CDR1 de la región variable nº 4 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(D))

<400> 95

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

40 <223> CDR2 de la región variable nº 1 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(A))

<400> 96

Ser	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Ser
1				5		

<210> 97

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <220>
<223> CDR2 de la región variable nº 3 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(C))

<400> 97
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

10 <210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>
<223> CDR2 de la región variable nº 4 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(D))

<400> 98
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <220>
<223> CDR3 de la región variable nº 1 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(A))

30 <400> 99
Gln Arg Thr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <220>
<223> CDR3 de la región variable nº 3 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(C))

40 <400> 100
Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 101
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <220>
<223> CDR3 de la región variable nº 4 de cadena ligera de F19 (F19 kappa(D))

50 <400> 101
Gln Gln Arg Ser Asn Trp His Pro
1 5

55 <210> 102
<211> 386
<212> ADN
<213> Homo sapiens

60 <220>
<223> ADNc de la región variable nº 1 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(A))

	<400> 102	
	atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60	
	agatgtgcca tccagttgac ccagttctcca tcttccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120	
	gtcaccatca cttgcccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180	
	aaaccaggga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc 240	
	ccatcaagggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300	
	cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccg tacacttttg 360	
	gccaggggac caagctggag atcaaaa 386	
5	<210> 103	
	<211> 384	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
10	<220>	
	<223> ADNc de la región variable nº 3 de cadena ligera kappa de E1 (E1 kappa(C))	
	<400> 103	
	atggaaaccc cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60	
	gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120	
	ctctcctaca gggccagtcag gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180	
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca 240	
	gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300	
	cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctg gacgttcggc 360	
	caagggacca aggtggaaat caaaa 384	
15	<210> 104	
	<211> 387	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<220>	
	<223> ADNc de la región variable nº 1 de cadena ligera kappa de F19 (F19 kappa(A))	
	<400> 104	
	atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctac tgctctgggt cccaggtgcc 60	
	agatgtgaca tccagttgac ccagttctcca tcttccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120	
	gtcaccatca cttgcccgggt gaggcagggc attagcagtt atttaaattg gtatcggcag 180	
	aaaccaggga aagttcctaa gctcctgac tatagtgcac ccaatttgca atctggagtc 240	
	ccatctcgggt tcagtgccag tggatctggg acagatttca ctctcactat cagcagcctg 300	
	cagcctgaag atgttgcaac ttattacggt caacggactt acaatgcccc tcccactttc 360	
25	ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaaa 387	
	<210> 105	
	<211> 387	
	<212> ADN	
30	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<223> ADNc de la región variable nº 3 de cadena kappa de F19 (F19 kappa(C))	
35	<400> 105	
	atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60	
	agatgtgtca tctggatgac ccagttctcca tcttactct ctgcatctac aggagacaga 120	
	gtcaccatca gttgtcggat gaggcagggc attagcagtt atttagcctg gtatcagcaa 180	
	aaaccaggga aagcccctga gctcctgac tatgctgcat ccactttgca aagtggggtc 240	
	ccatcaagggt tcagtgccag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagctgcctg 300	
	cagtctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttat atagtttccc gtacactttt 360	
	ggccaggggga ccaagctgga gatcaaaa 387	
	<210> 106	
	<211> 380	
40	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	

ES 2 643 687 T3

<223> ADNc de la región variable nº 4 de cadena kappa de F19 (F19 kappa(D))

<400> 106

```
atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gggtgtttag agctacttag cctggtagca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggetcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggcc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcatcccg tccggccaagg 360
gaccaagggt gagattcaaa                                     380
```

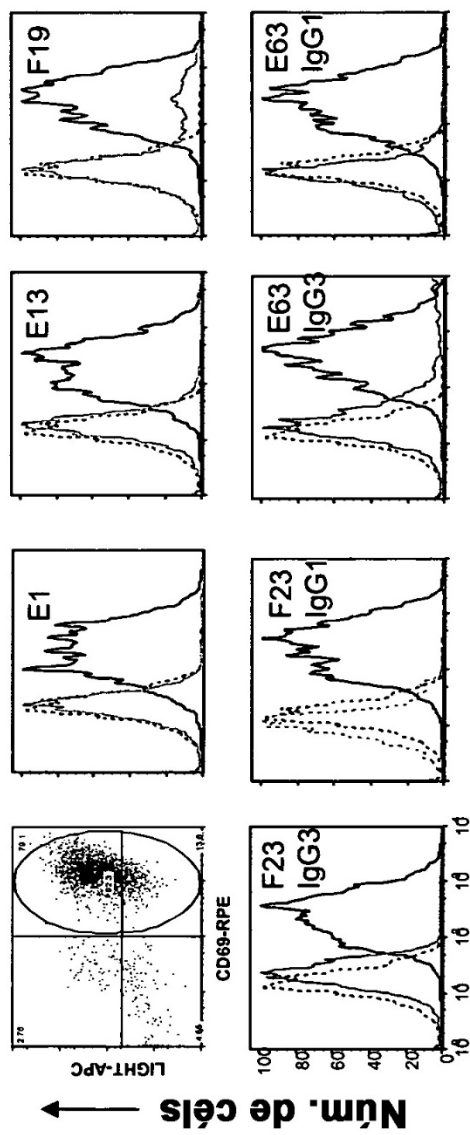
REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado o fragmento de unión a hLIGHT del mismo, en el que el anticuerpo y el fragmento del mismo se unen a la forma trimérica pero no a la monomérica de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo y por el fragmento resulta bloqueada competitivamente por un anticuerpo producido por el hibridoma de nº de acceso de ATCC PTA-7819, y en el que la unión no resulta bloqueada competitivamente por los anticuerpos producidos por los hibridomas de nº de acceso de ATCC PTA-7729, PTA-7842 y PTA-7818, en el que el anticuerpo y el fragmento inhiben la unión de HVEM y LTβR a hLIGHT, y en el que el anticuerpo y el fragmento se unen a las variantes de polimorfismo de nucleótido único (SNP) 214E-32S y 214K-32S, 214E-32L y 214K-32L de hLIGHT, en el que el anticuerpo es un anticuerpo antagonista.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según la reivindicación 1, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo y por el fragmento resulta bloqueada competitivamente por un anticuerpo producido por el hibridoma de nº de acceso de ATCC PTA-7728.
3. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo compite con HVEM, LTβR o una proteína de fusión de los mismos, para unirse a hLIGHT expresado sobre la superficie celular o hLIGHT soluble.
4. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende: un dominio VH que presenta la secuencia de aminoácidos desde el residuo 27 al residuo 143 de la SEC ID nº 5 y un dominio VL que presenta la secuencia de aminoácidos desde el residuo 23 al residuo 129 de la SEC ID nº 10.
5. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 23, una CDR2 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 24 y una CDR3 de VH que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 25; y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 38, una CDR2 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 39 y una CDR3 de VL que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 40.
6. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende VH y VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso de ATCC PTA-7728.
7. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende (a) una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH y (b) una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que presenta el nº de acceso de ATCC PTA-7728.
8. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es producido por un hibridoma que presente el nº de acceso de ATCC PTA-7728.
9. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo humanizado.
10. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
11. Anticuerpo o fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
12. Fragmento de unión a hLIGHT según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el fragmento es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un Fv de cadena única (scFv), un dianticuerpo, un trianticuerpo o un minianticuerpo.
13. Composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14.
16. Célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 15.
- 5 17. Procedimiento de producción del anticuerpo o del fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende: cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 16, que presenta expresado el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo y recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo.
- 10 18. Hibridoma que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
19. Hibridoma según la reivindicación 18 que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 12, en el que el hibridoma presenta el nº de acceso de ATCC PTA-7728 (124 F23).
- 15 20. Composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un portador farmacéuticamente aceptable.
21. Kit que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a hLIGHT del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o kit que comprende la composición según la reivindicación 13.

FIGURA 1

A.



B.

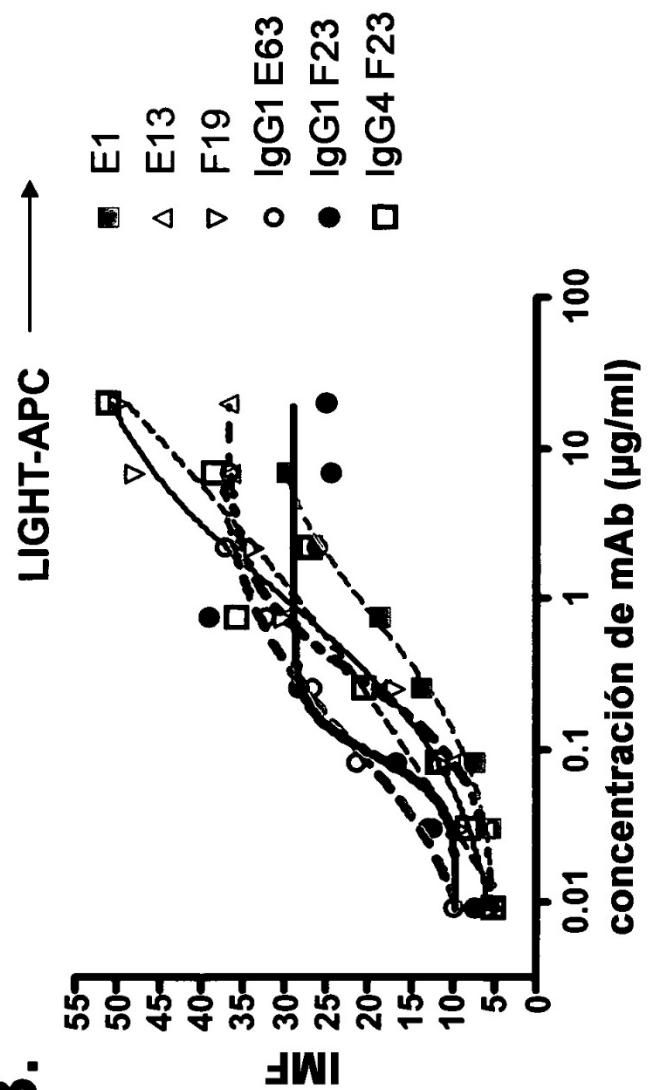


FIGURA 2

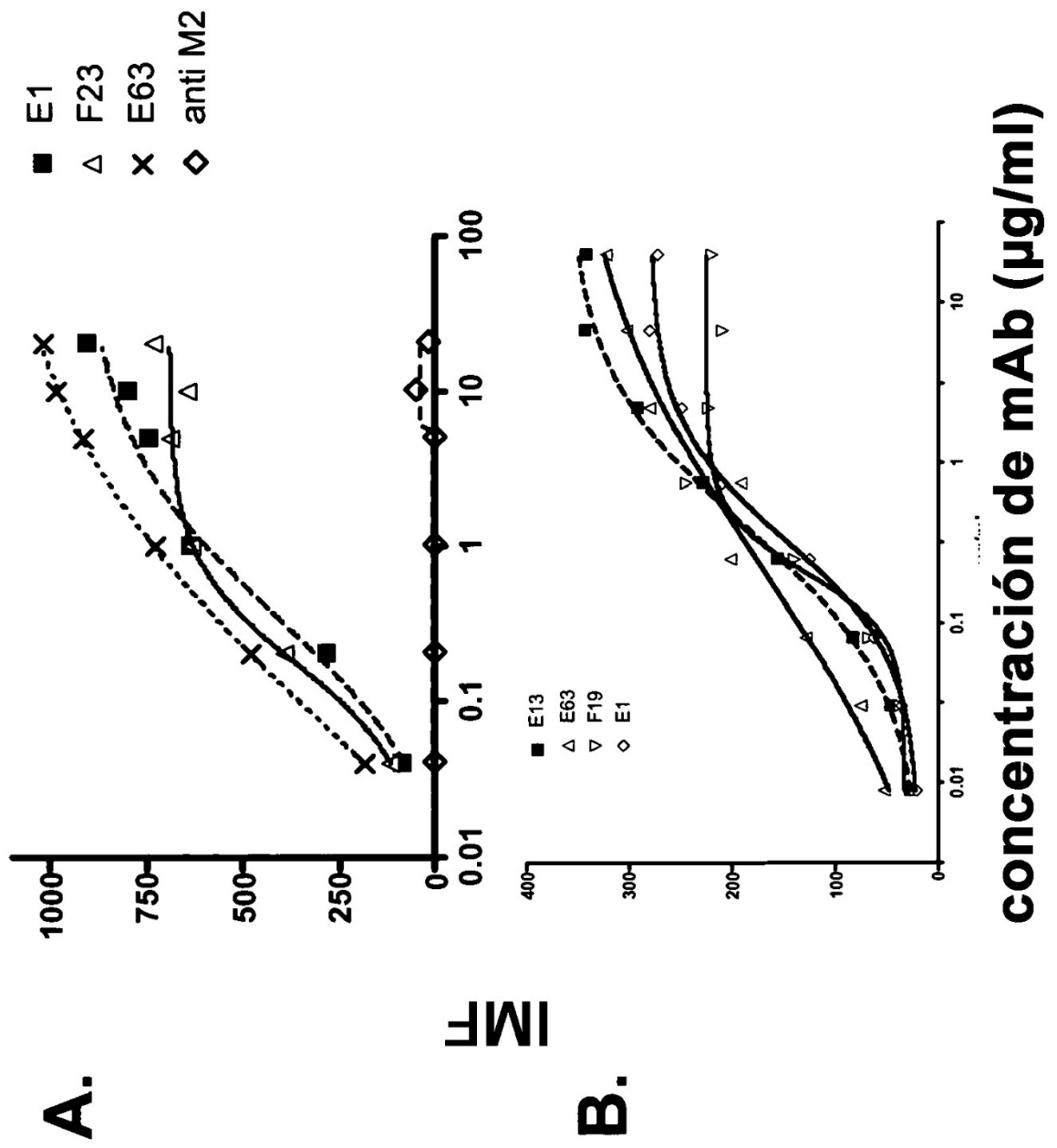


FIGURA 3

Nombre	Unión a LIGHT _h sobre célis. EL4GFP LIGHT _h		Bloqueo de unión de LIGHT en superficie celular a HVEM:Fc				Bloqueo de unión de LIGHT en superficie celular a RLTB:Fc				Bloqueo de CCL20	Isotipo	Grupo de epitopos
	afinidad relativa	EC50 (µg/ml)	Humano	IC50 (µg/ml)	de ratón	IC50 (µg/ml)	Humano	IC50 (µg/ml)	de ratón	IC50 (µg/ml)			
124E 63	+++	0.1	++++	0.19	-	-	++++	1.3	+++	0.43	+	IgG3	A
124E 1	+++	0.32	++++	0.2	+++	0.64	+++	1.7	+++	2.8	+	IgG1	A
124F 23	+++	0.18	+++	0.29	-	-	+++	2.1	-	-	+	IgG4	B
124E13	+++	0.3	++	0.41	NA	NA	+++	1.8	+++	NA	+	IgG1	A
124F 19	+++	0.21	NA	NA	NA	NA	++	4.2	++	3.9	+	IgG1	B

FIGURA 4

mAb de recubrimiento

<u>mAb pre-inc.</u>	<u>E1</u>	<u>E13</u>	<u>E63</u>	<u>F19</u>	<u>F23</u>
E1	95	82	89	0	0
E13	98	97	98	0	0
E63	87	90	84	0	22
F19	0	0	0	98	98
F23	0	0	0	53	87

Epítipo nº 1 de LIGHT_h ("anticuerpos E")	E1, E13, E63
Epítipo nº 2 de LIGHT_h ("anticuerpos F")	F19, F23

FIGURA 5

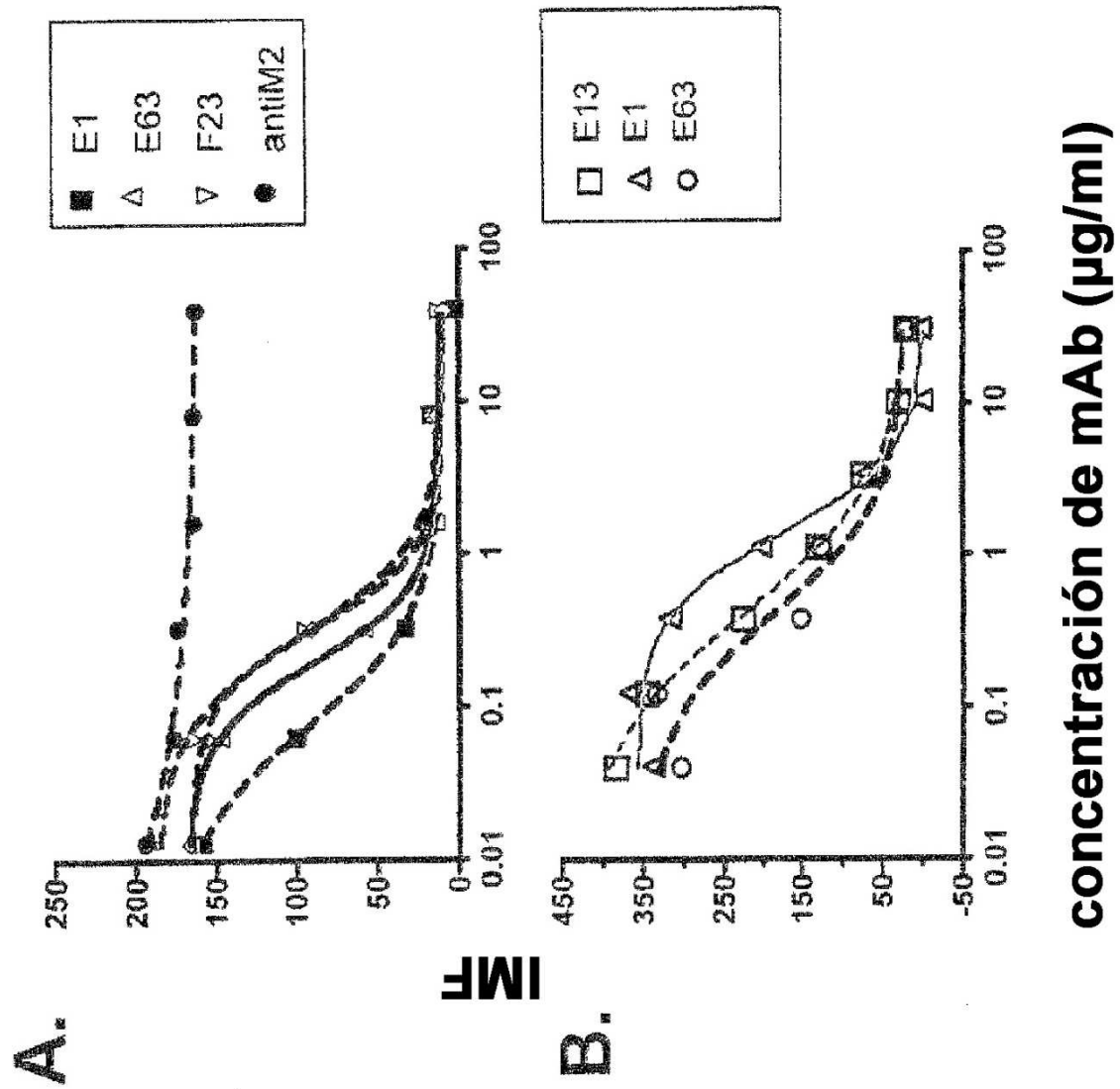


FIGURA 6

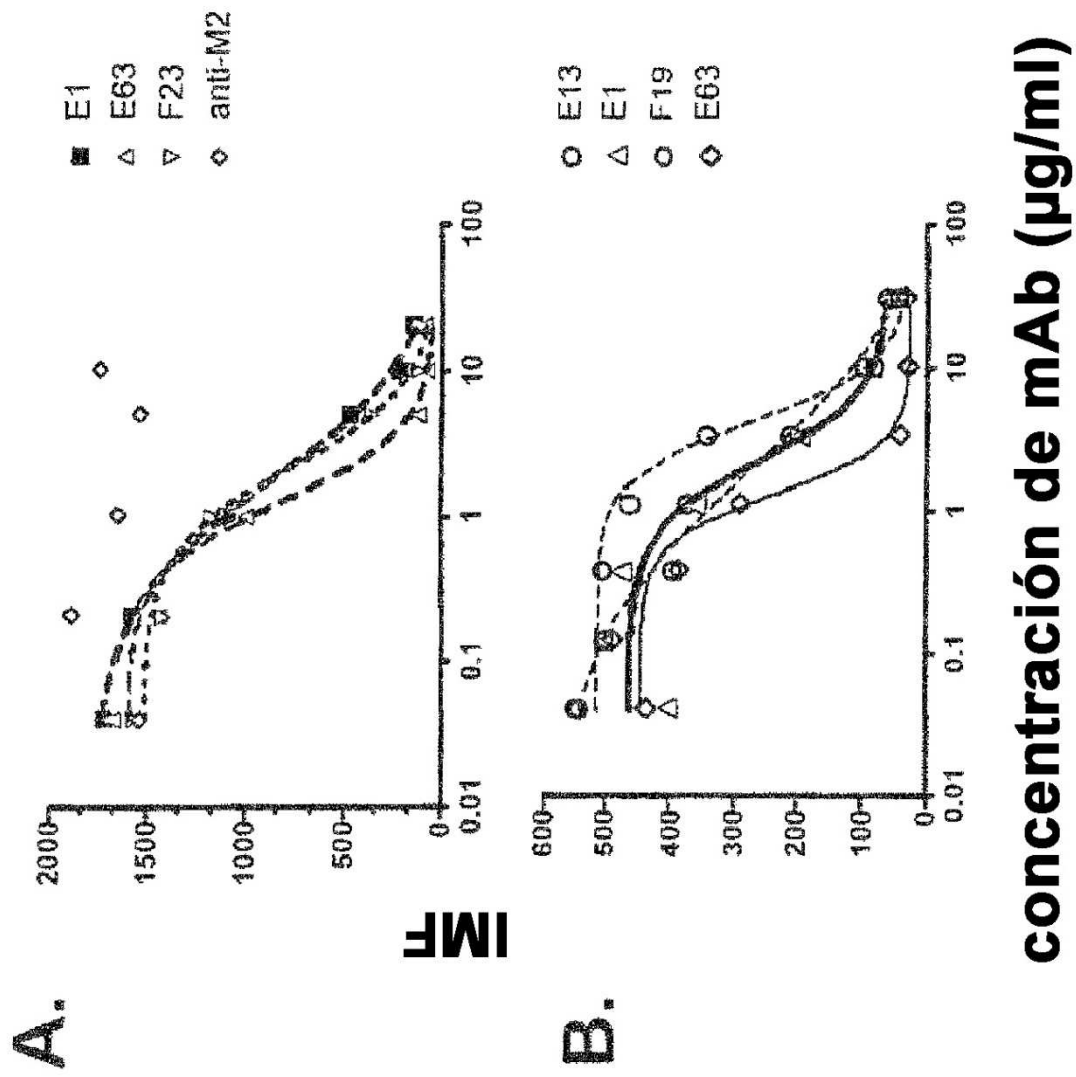


FIGURA 7

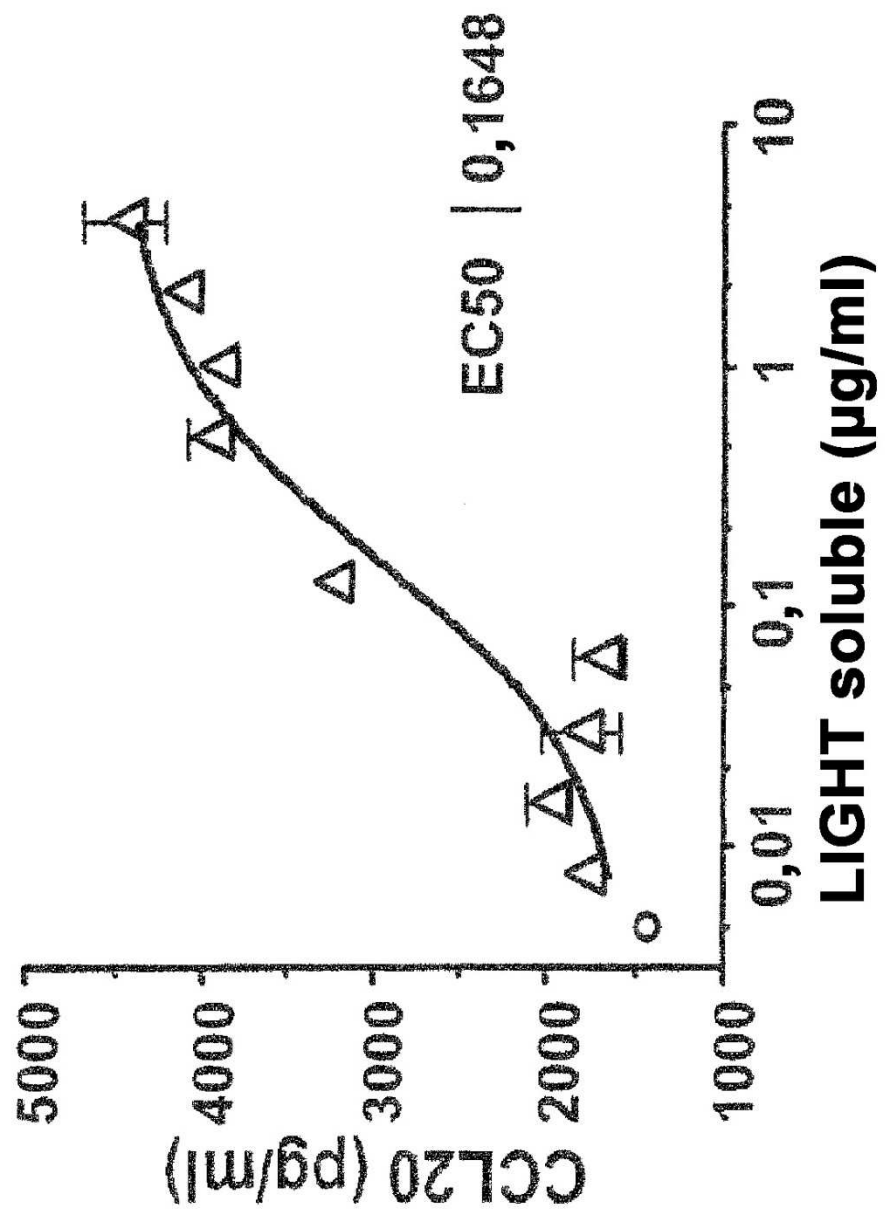
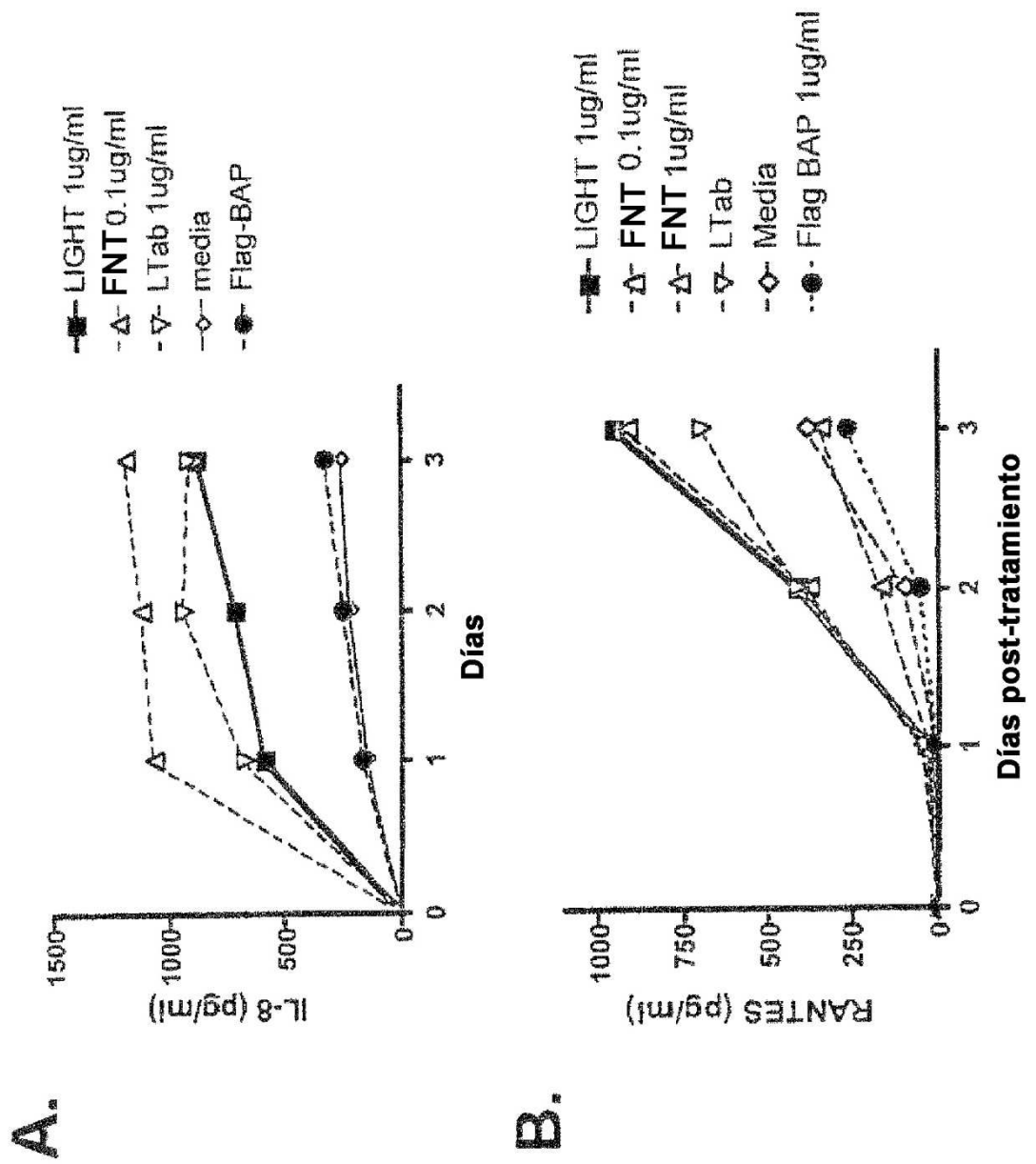


FIGURA 8



A.

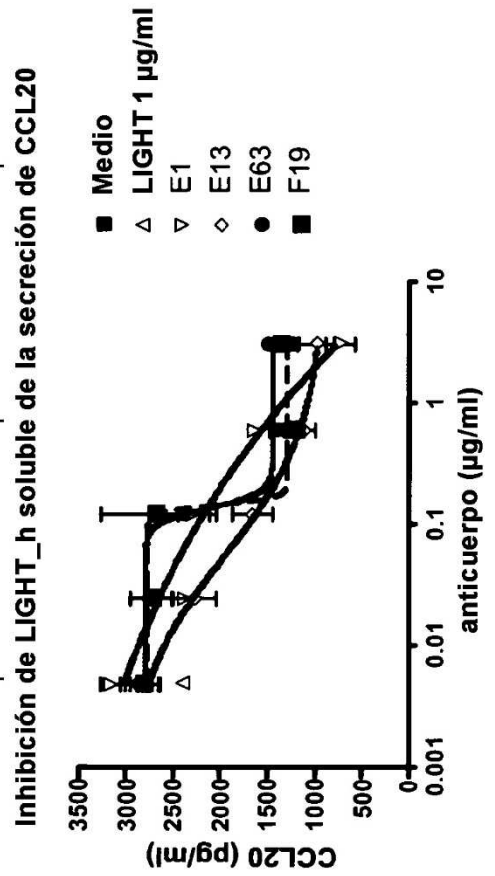
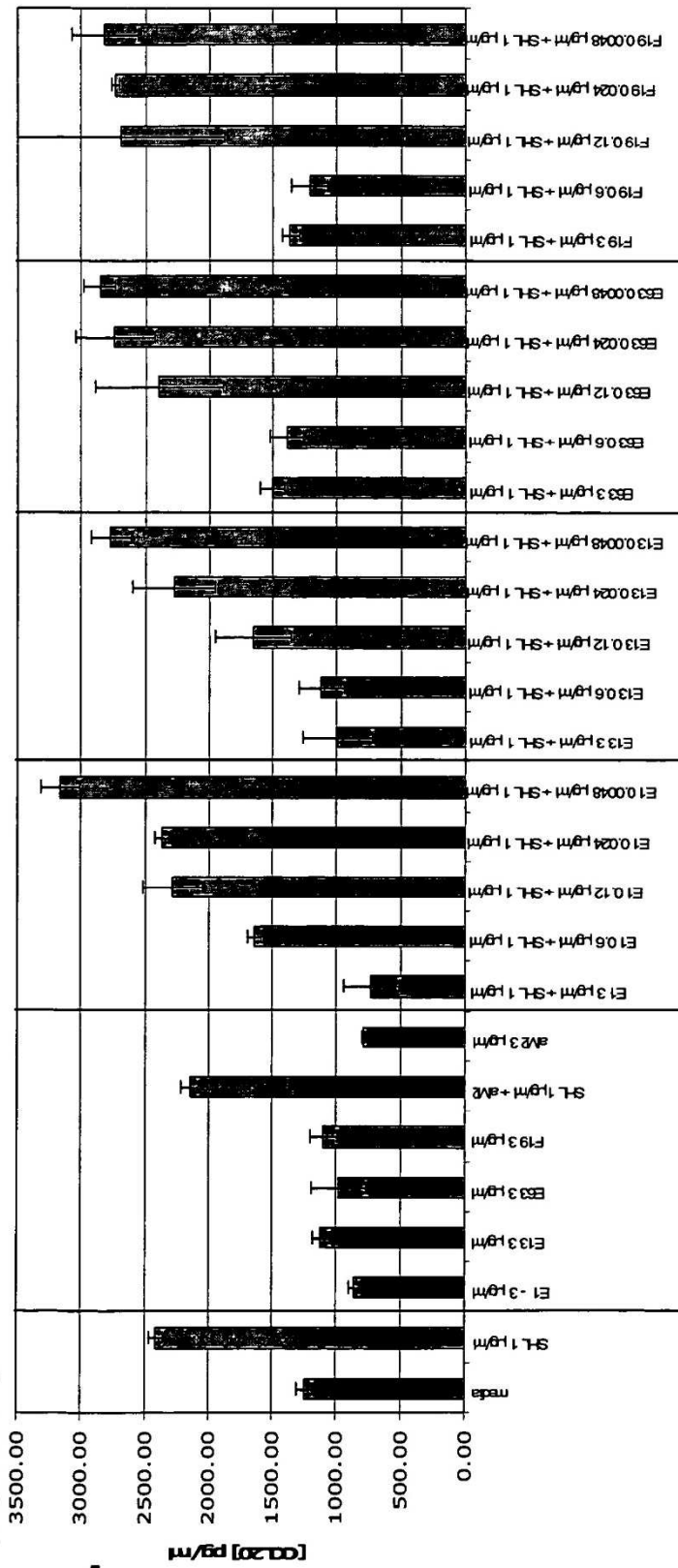


FIGURA 10

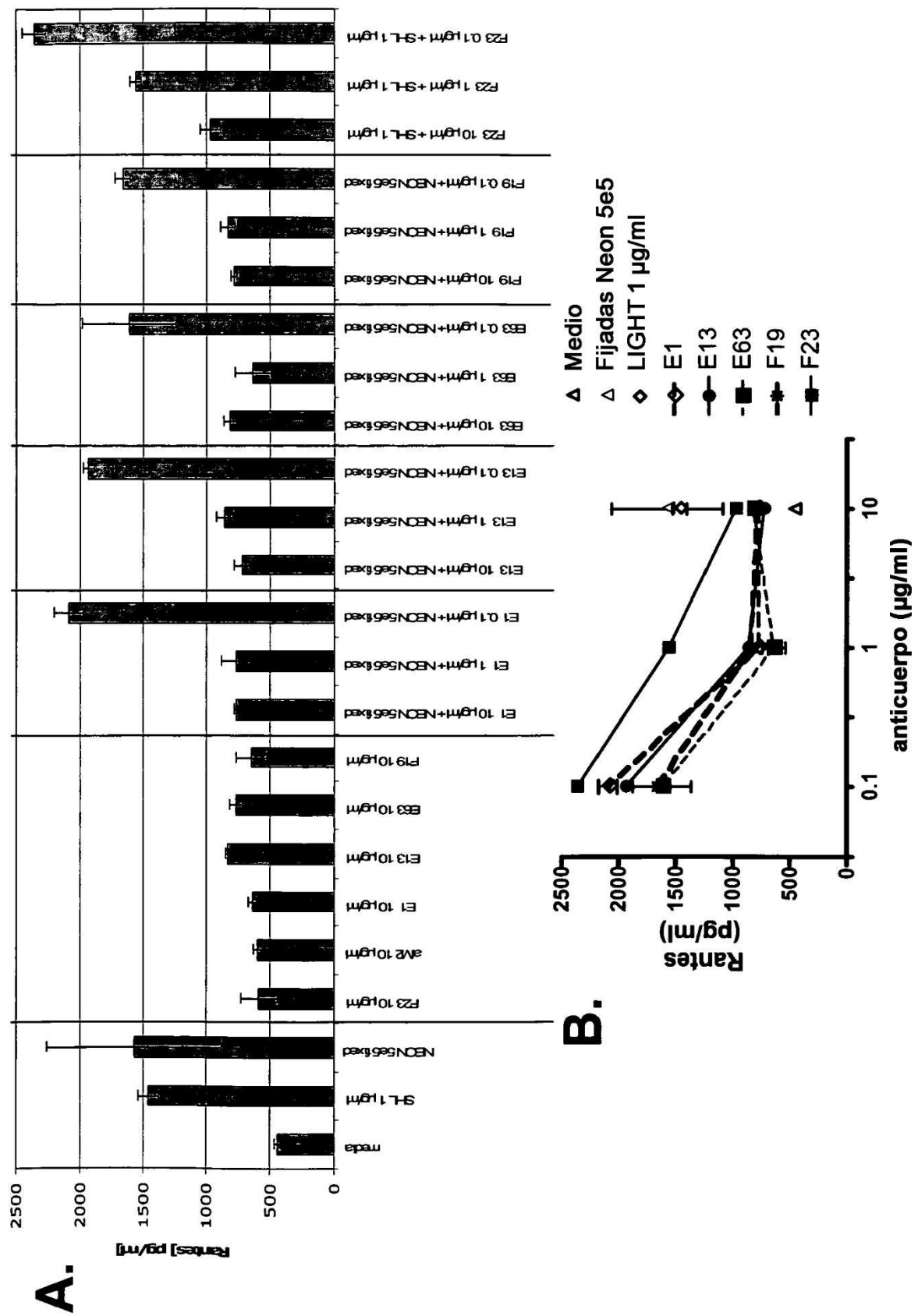


FIGURA 11

antic. soluble	Ab de recubr.					
	E1	B12	F19	R&D mAb	Abnova	E45
E1	94	22	15	99	0	99
B12	17	97	16	0	61	11
F19	4	0	99	99	0	7
R&D mAb	47	0	86	92	0	78
Abnova	30	97	15	38	89	64
E45	60	5	8	99	64	98
AntiM2	0	0	0	0	0	0

Antic. monoclonales

Antic. policlonales

FIGURA 12

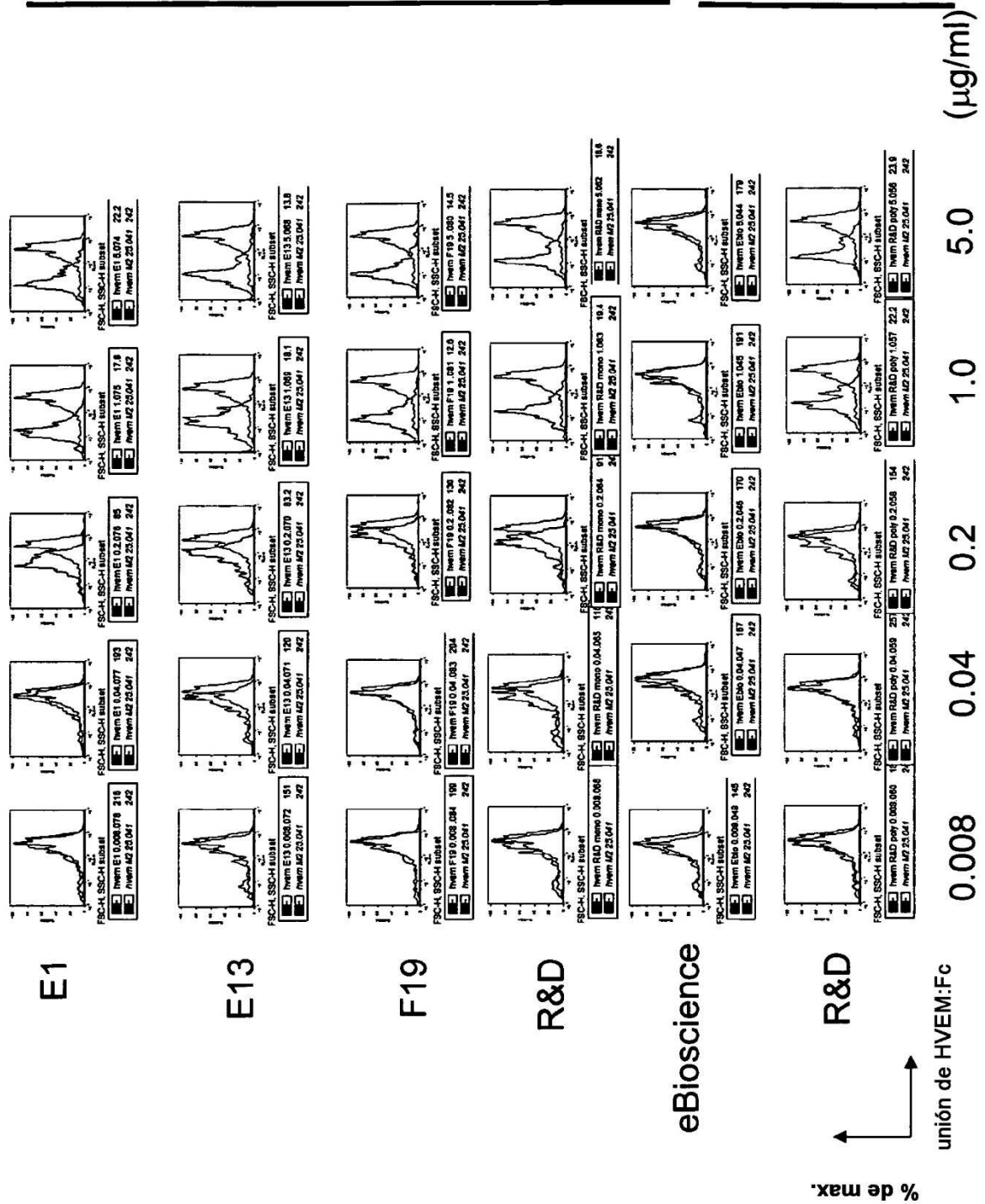


FIGURA 13

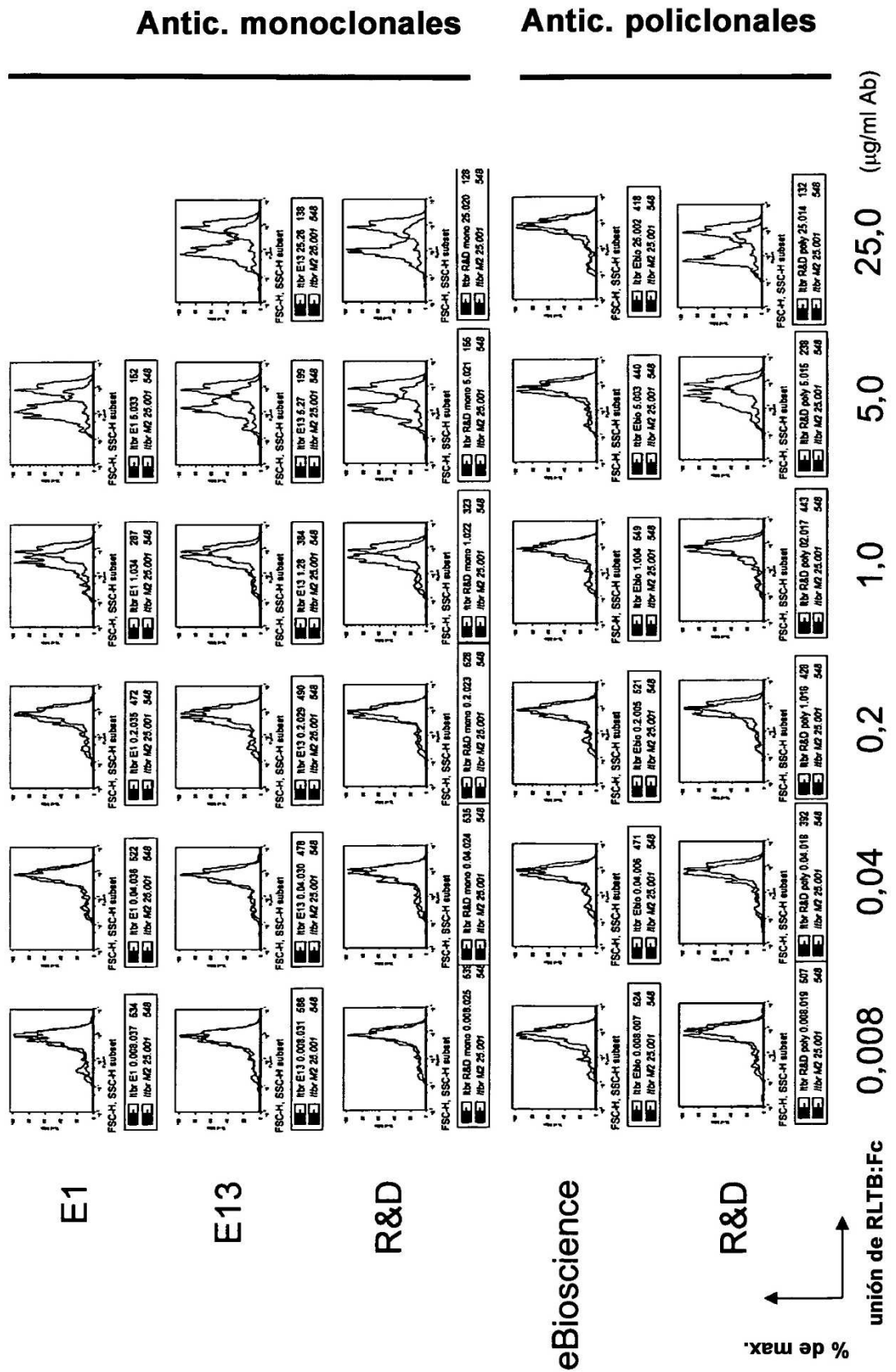


FIGURA 14

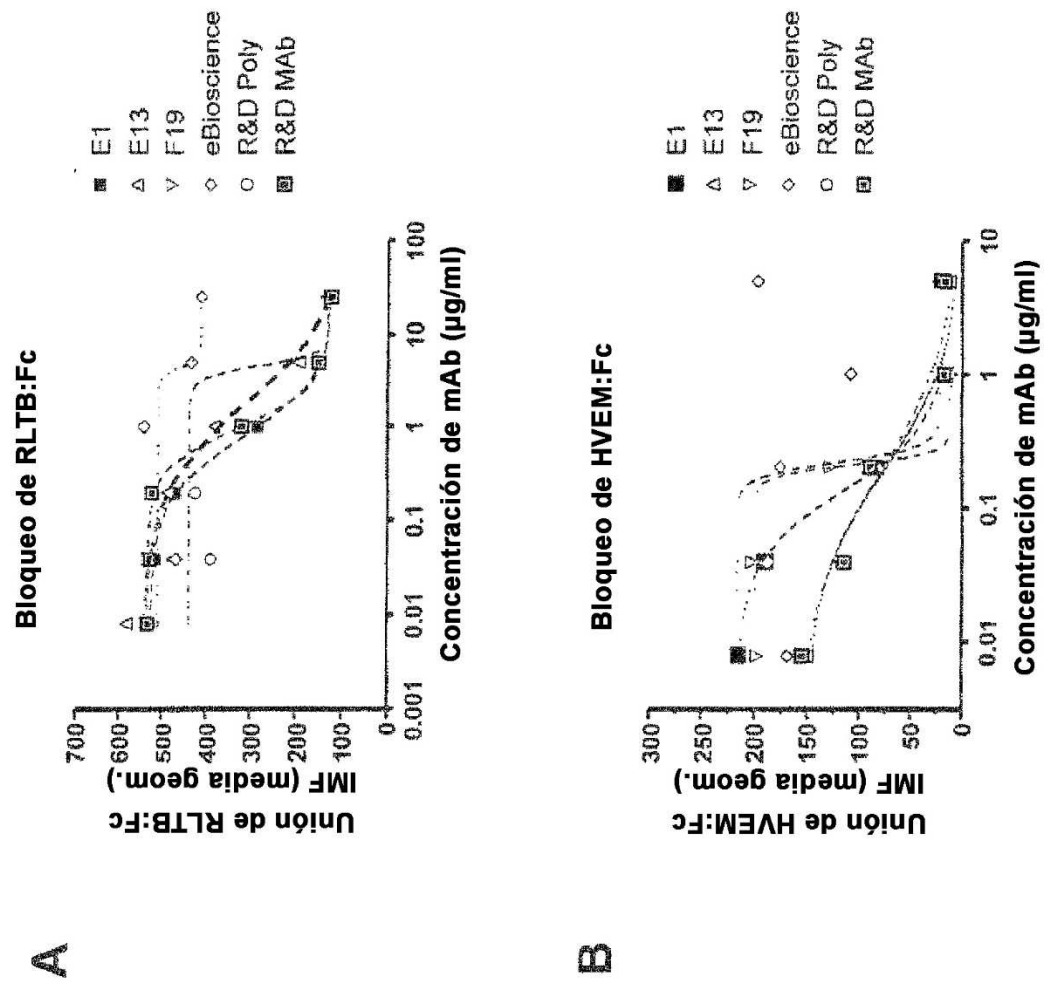


FIGURA 15

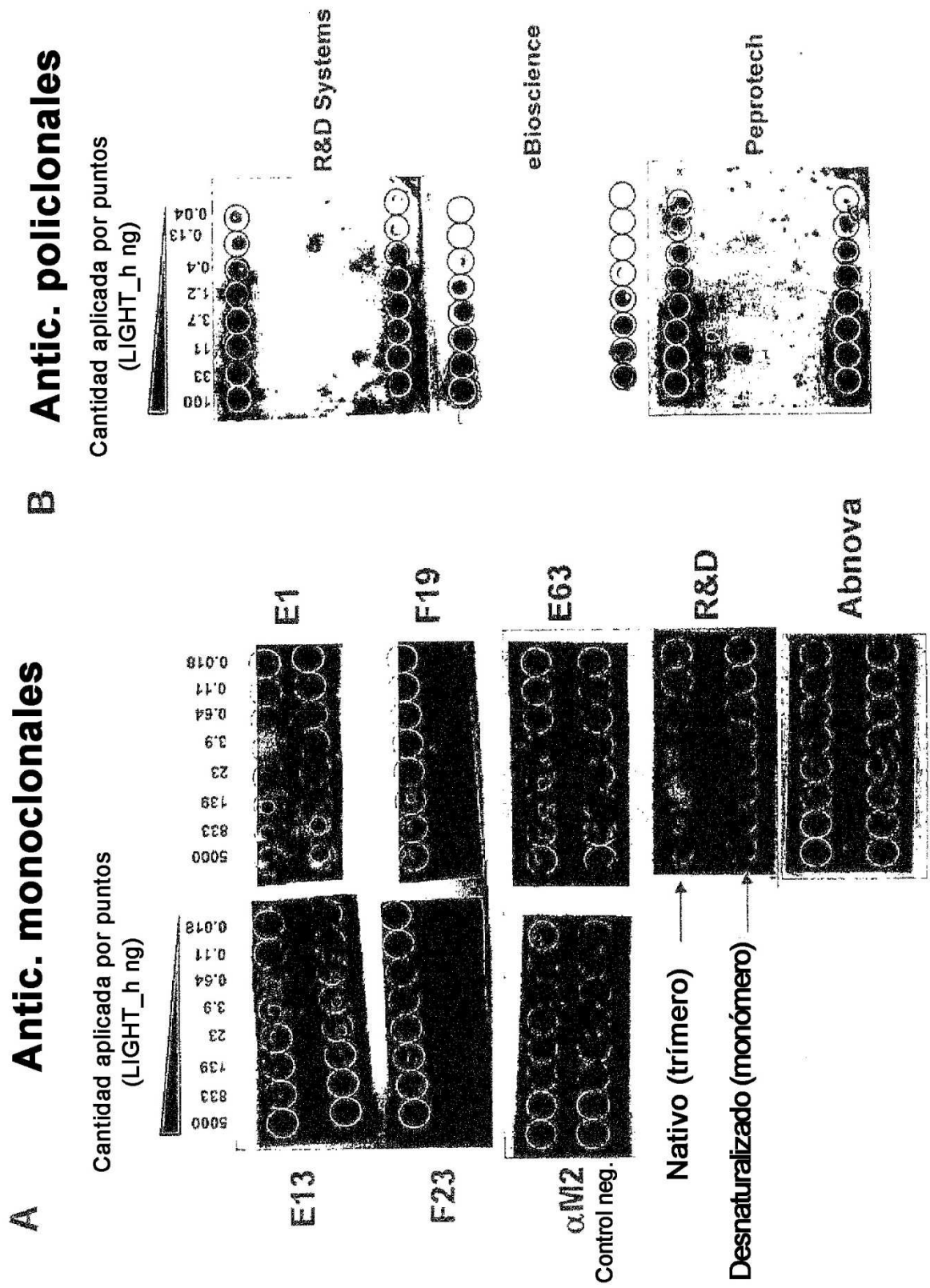


FIGURA 16

Monoclonales

Policlonales

Anticuerpo	Nativo-trímero *	Desnaturalizado-monómero *
E1 (mAb humano)	23	139
E13 (mAb humano)	0.64	0.64
E63 (mAb humano)	3.9	139
F19 (mAb humano)	23	>5000
F23 (mAb humano)	23	>5000
Abnova (mAb de ratón)	0.64	0.64
R&D Systems (mAb de ratón)	23	139
R&D Systems (pAb de cabra)	0.04	0.13
eBiosciences (pAb de conejo)	0.4	1.2
Preprotech (pAb de conejo)	0.04	0.13

* Límite de detección (cantidad más baja de LIGHT detectado (ng))

FIGURA 17

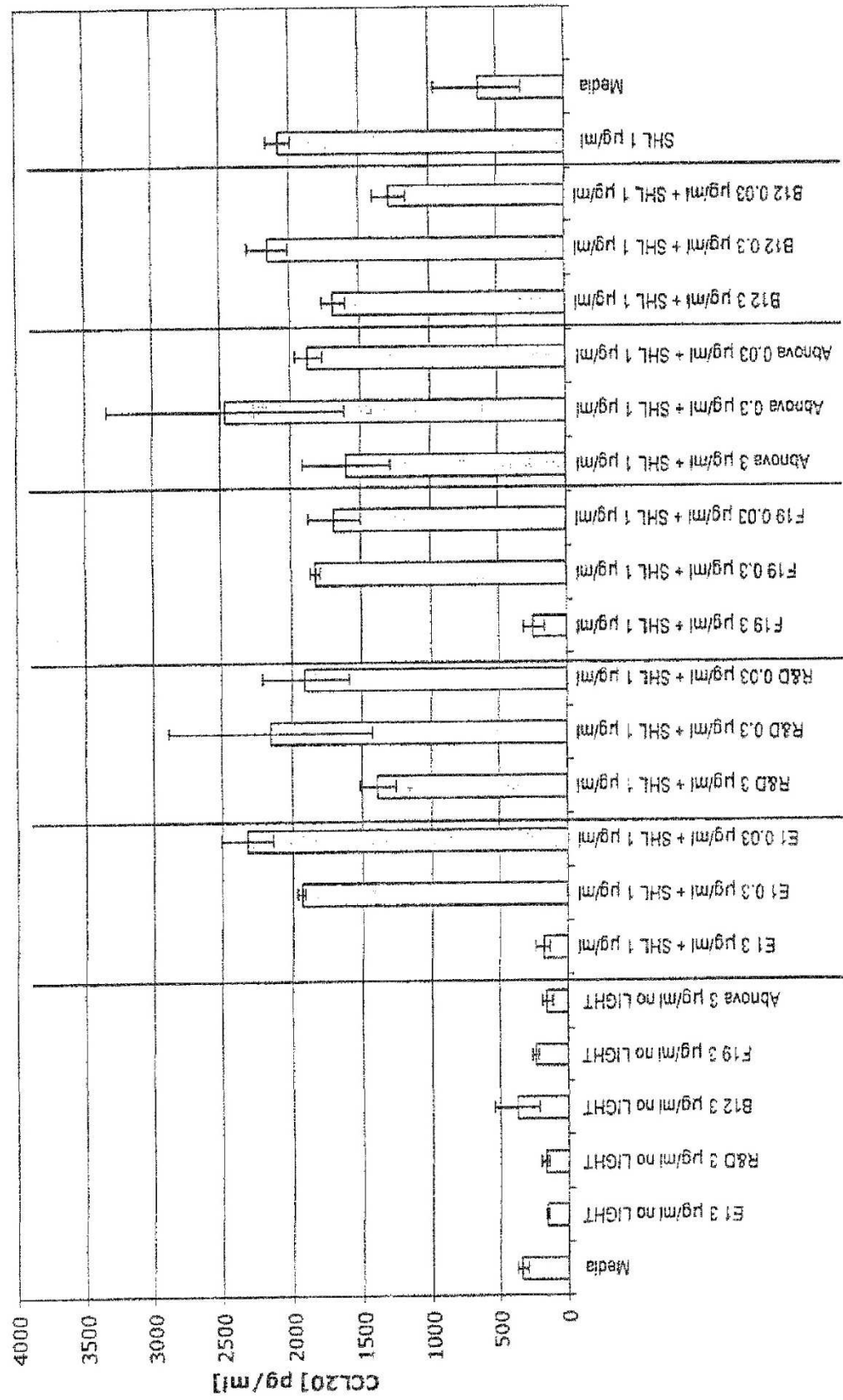


FIGURA 18

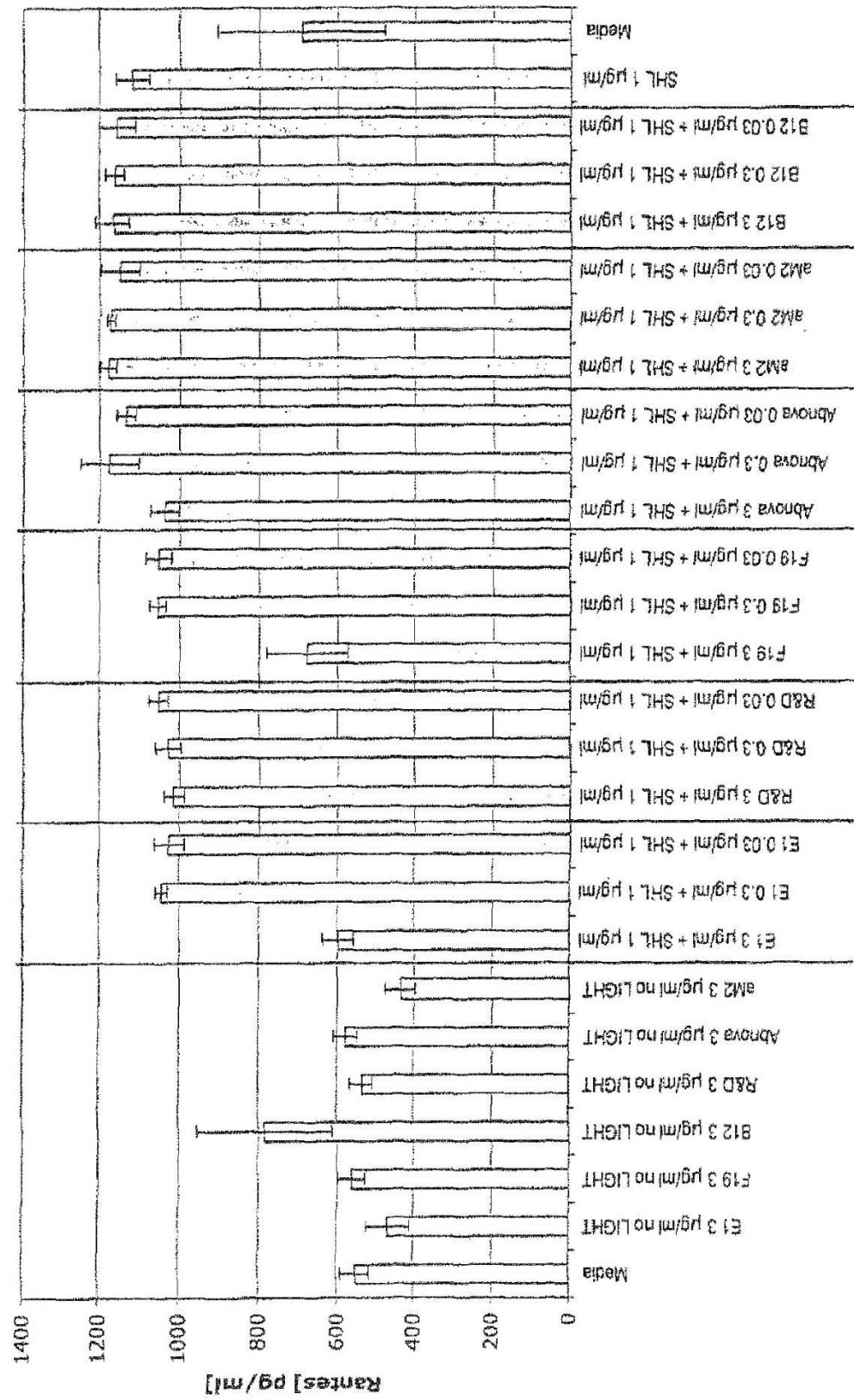


FIGURA 19

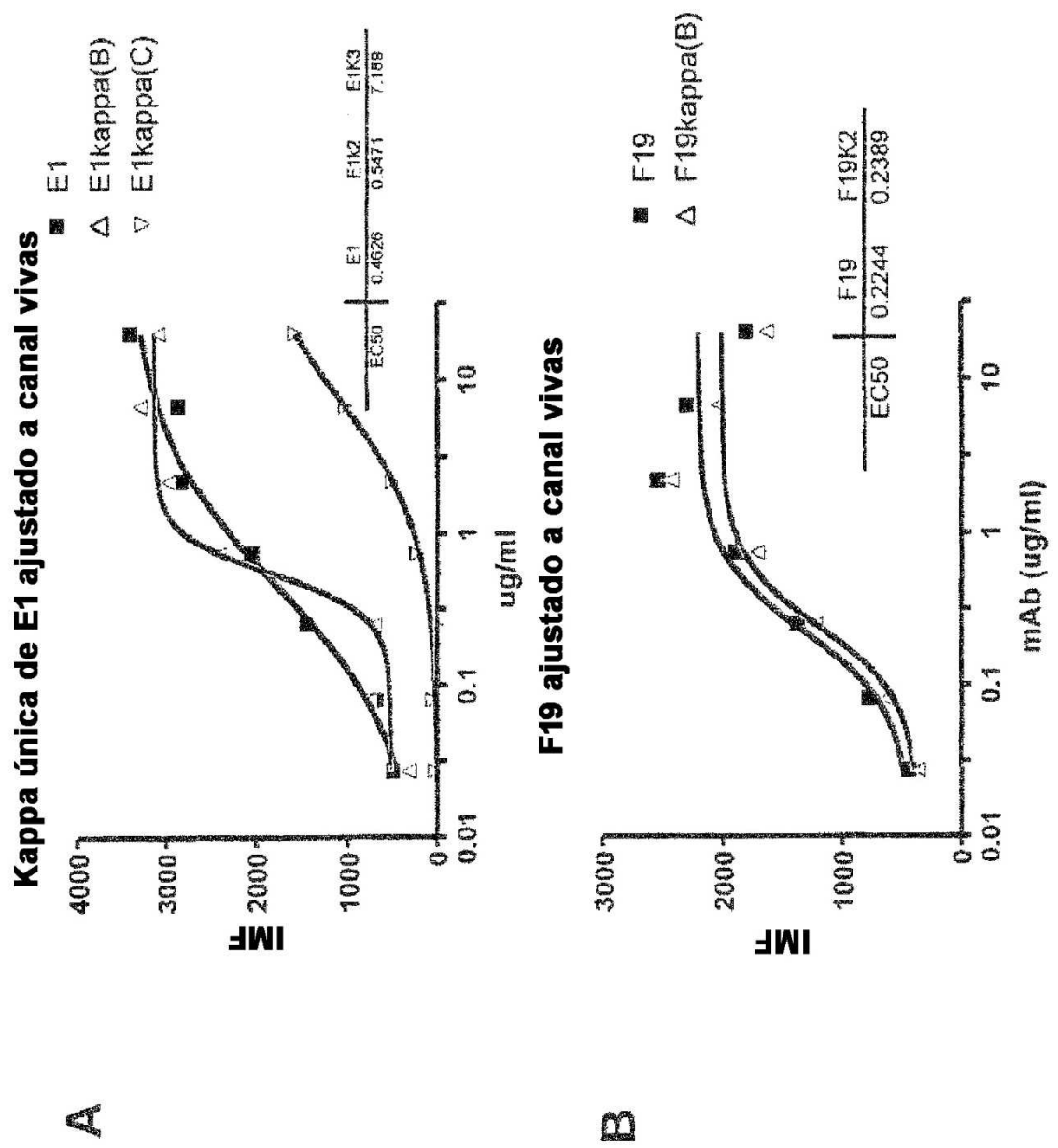


FIGURA 20

Antic. soluble	E1	Antic. de recubr.	F19	F19kappa(B)
E1	90	91	0	0
E1kappa(B)	92	92	0	0
F19	0	0	98	98
F19kappa(B)	0	24	98	98
AntiM2	0	0	0	0

FIGURA 21

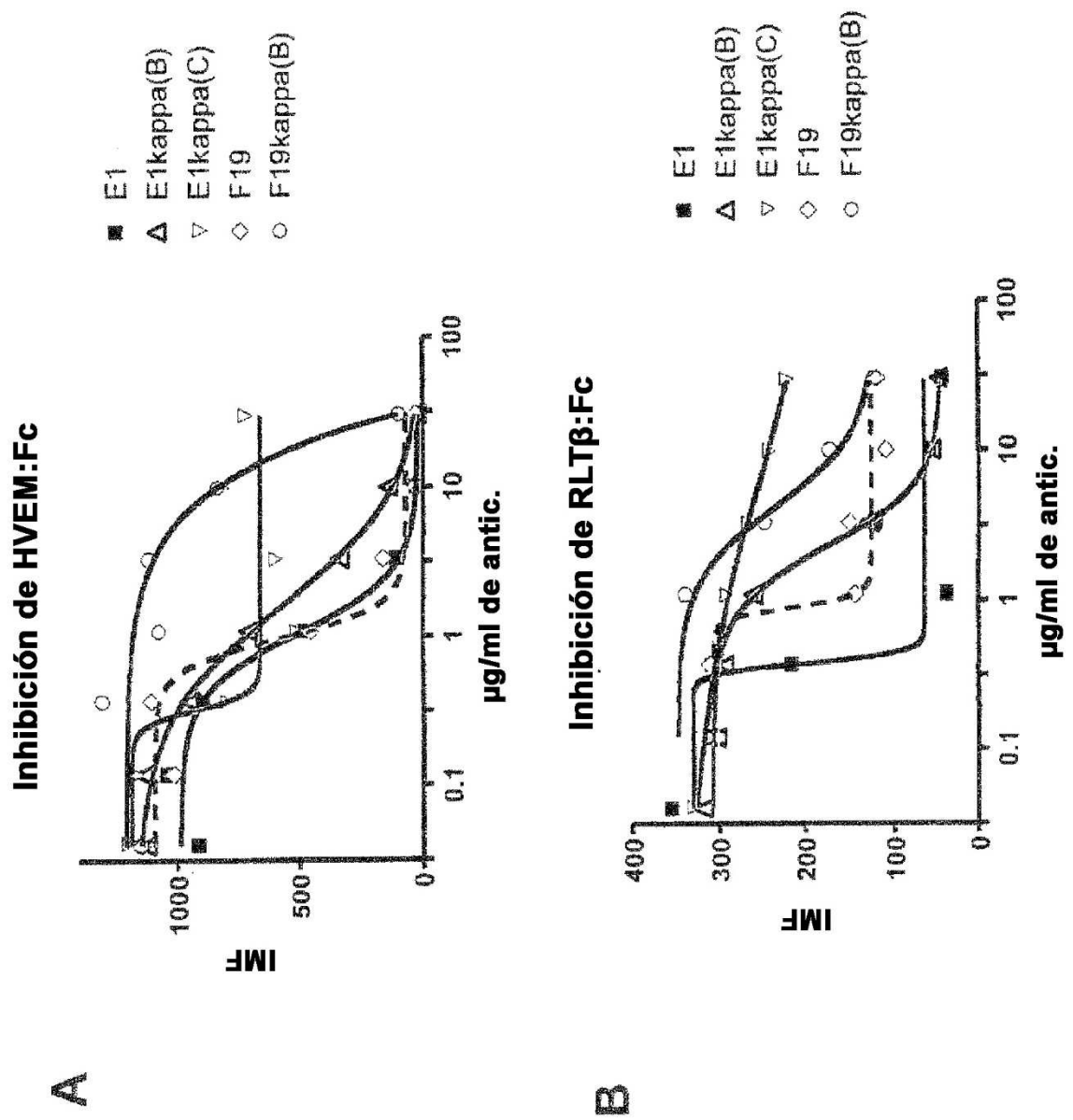


FIGURA 22

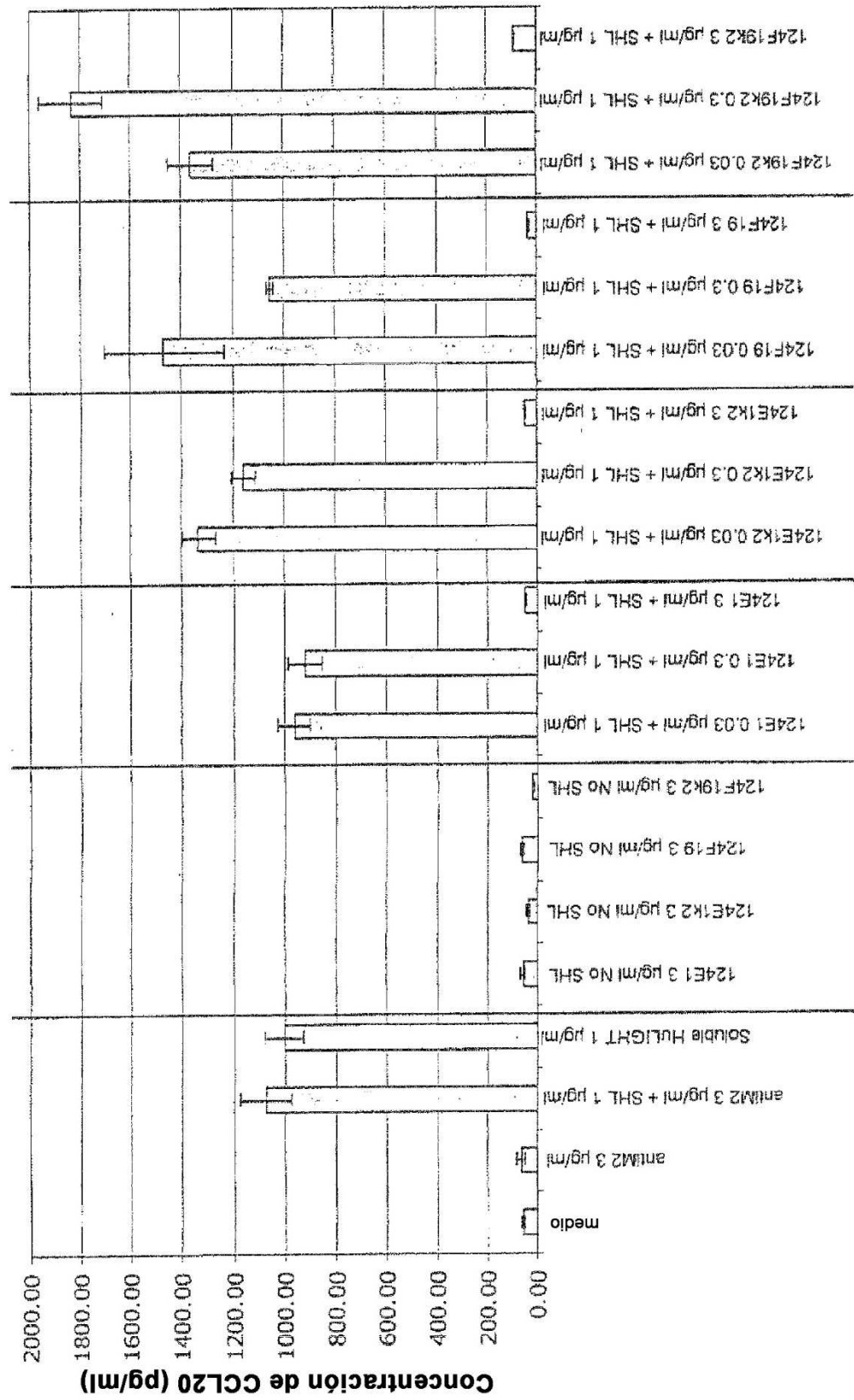


FIGURA 23

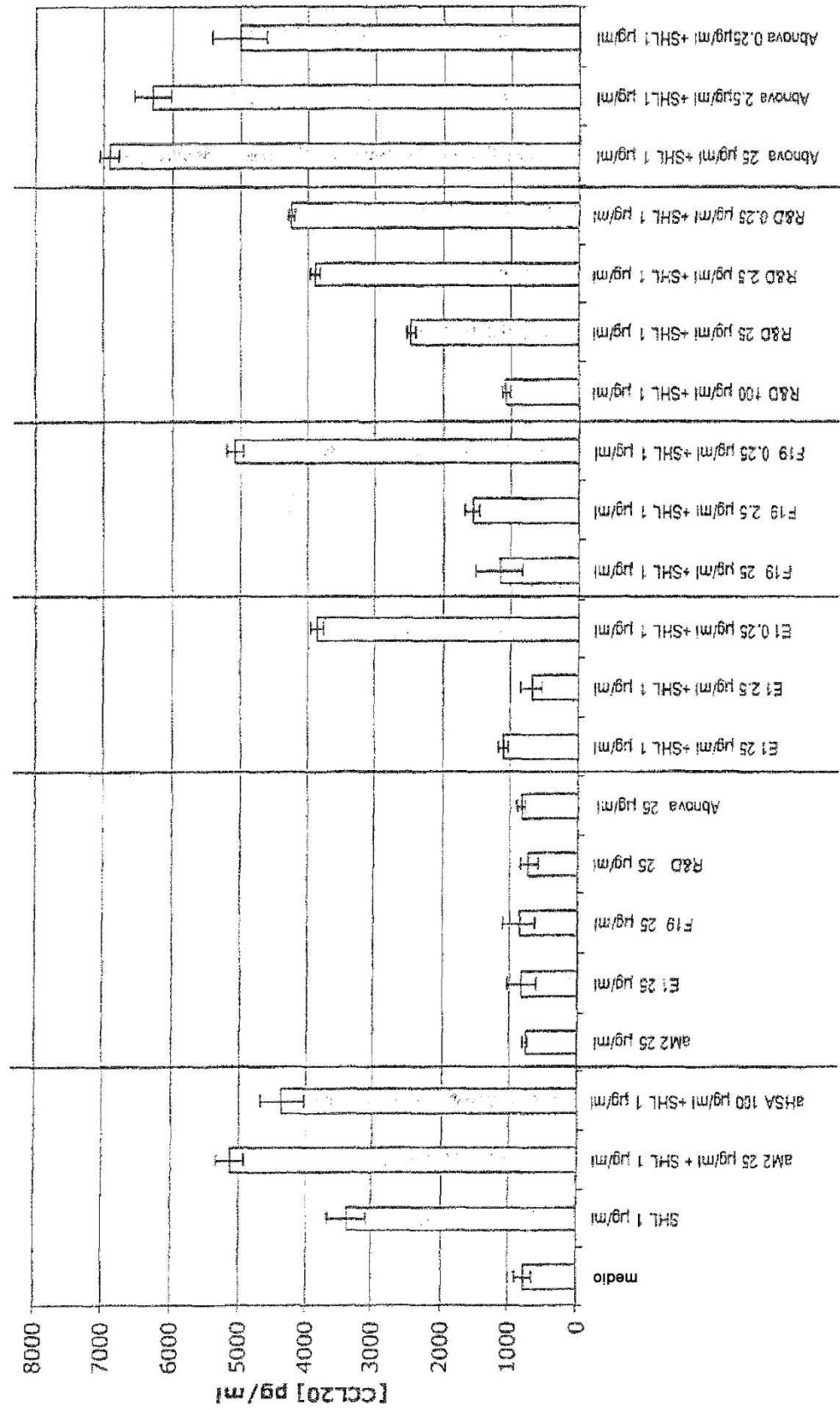


FIGURA 24

A.

Extracelular: aa 214

Diversidad poblacional		TNFSF14 SNP aa 214		Frecuencia alélica	
Población	Grupo Individual	A	G		
WICGR8 asiático agrupado		0.120	0.880		
WICGR6 caucásico agrupado		0.020	0.980		
CEPH		0.080	0.920		
HapMap-CEU	Europeo	0.042	0.958		
HapMap-HCB	Asiático	0.011	0.989		
HapMap-JPT	Asiático	0.136	0.864		
HapMap-YRI	África subsahariana	0.033	0.967		
población AGI/ASP	Afroamericano	0.050	0.950		

alelo	residuo	pos. de
dbPNU	proteico	aminoácido

G	Glu	E	214
A	Lys	K	214

B.

Citoplasmático: aa 32

Diversidad poblacional		FNTSF14 PNU aa 32		Frecuencia alélica	
Población	Grupo Individual	C	T		
AFD EUR PANEL	Europeo	1.000			
AFD AFR PANEL	Afroamericano	1.000			
AFD CHN PANEL	Asiático	0.979	0.021		
HapMap-CEU	Europeo	1.000			
HapMap-HCB	Asiático	0.989	0.011		
HapMap-JPT	Asiático	1.000			
HapMap-YRI	África subsahariana	1.000			

alelo	residuo	pos. de
dbPNU	proteico	aminoácido

T	Leu	L	32
C	Ser	S	32

FIGURA 25

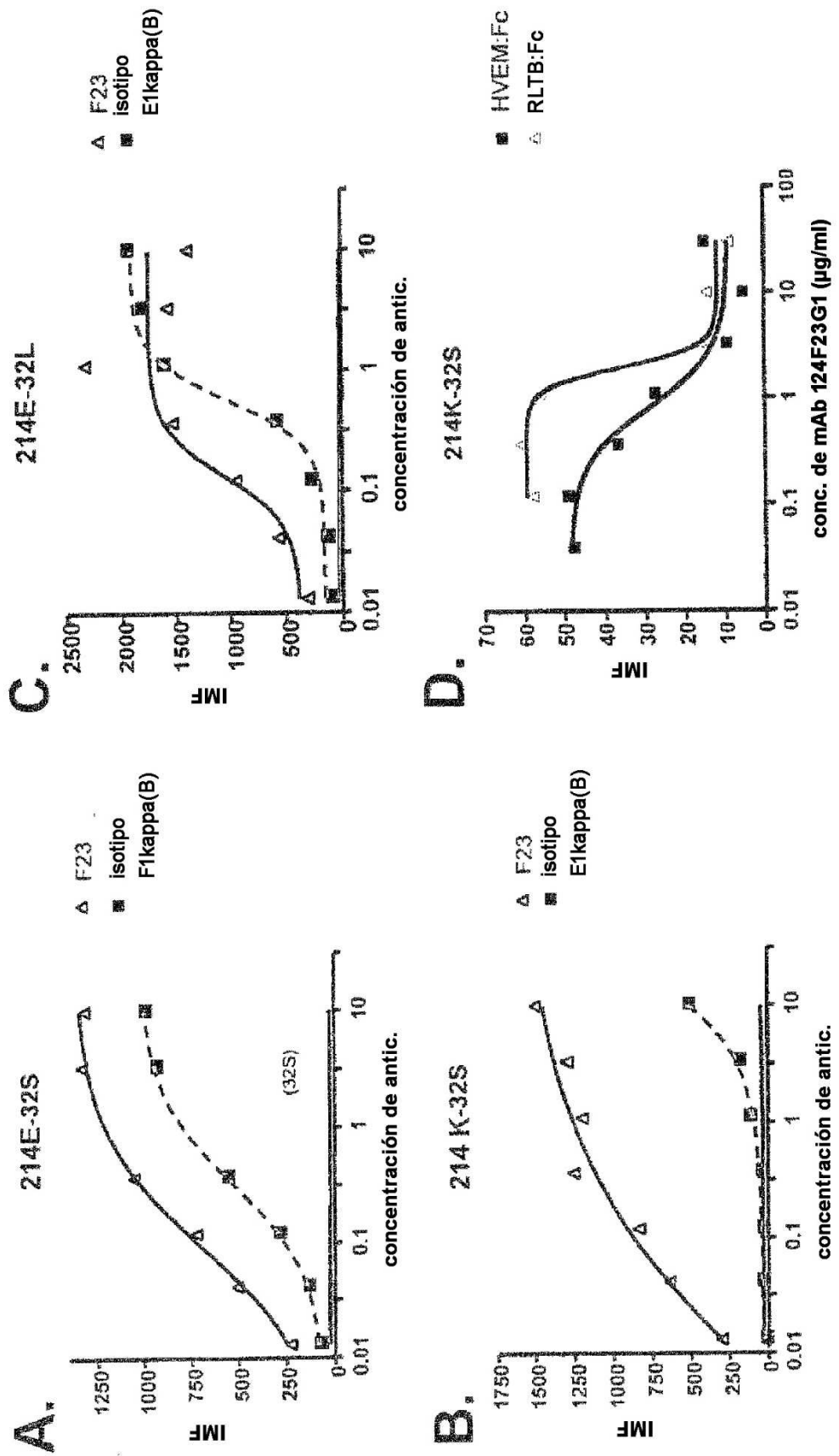


FIGURA 26

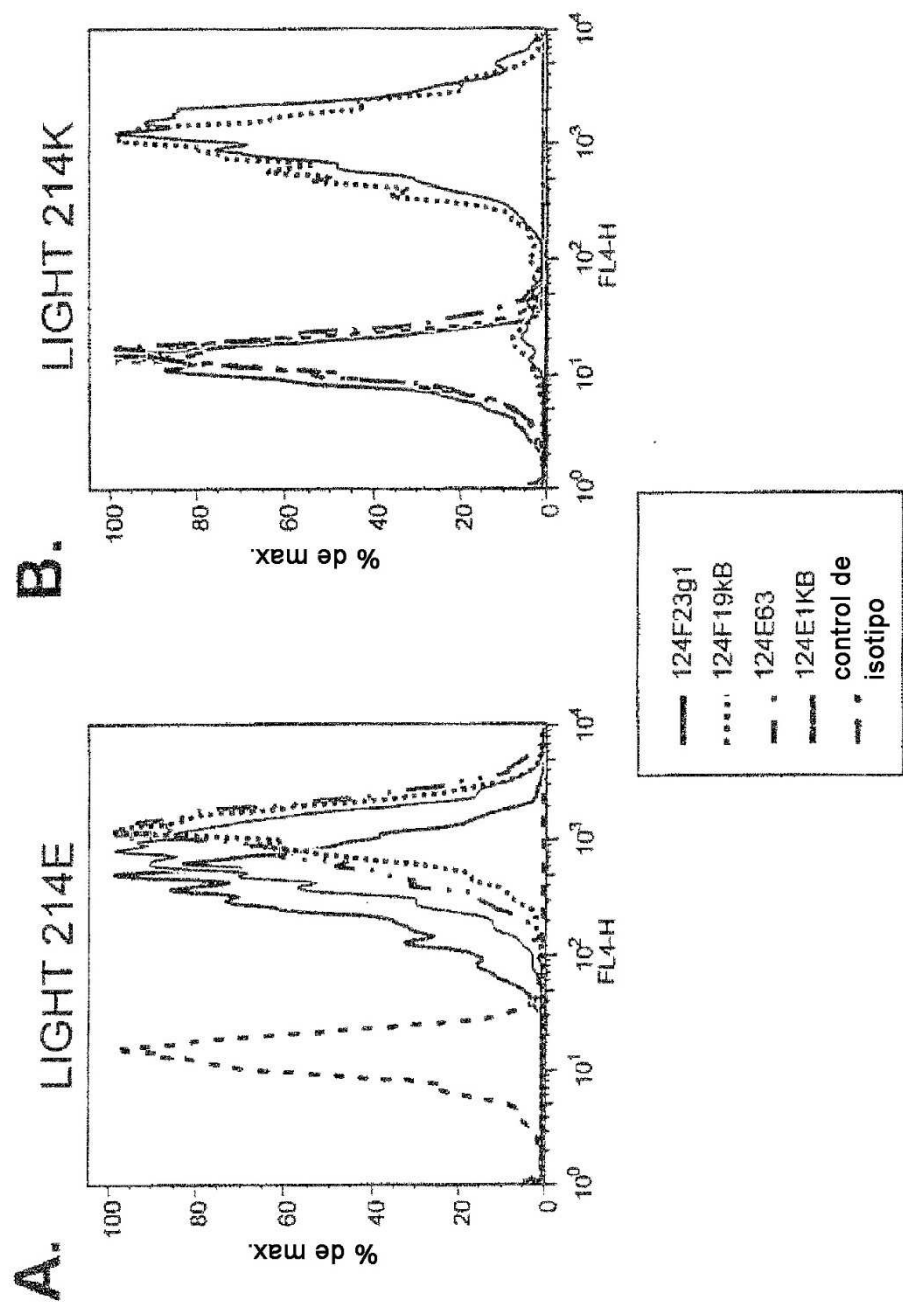


FIGURA 27

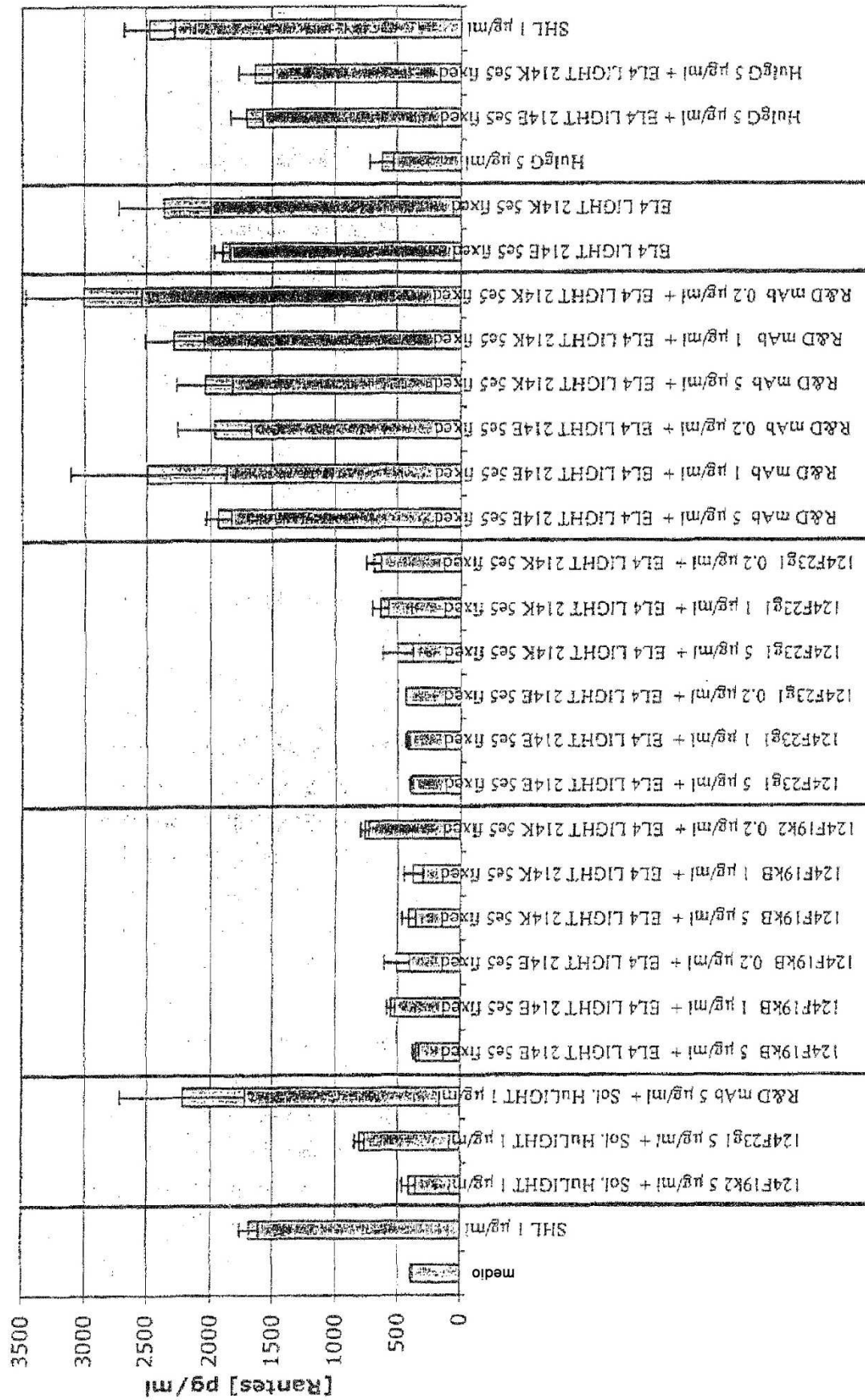


FIGURA 28

Modelo de EICH xenogénico agudo

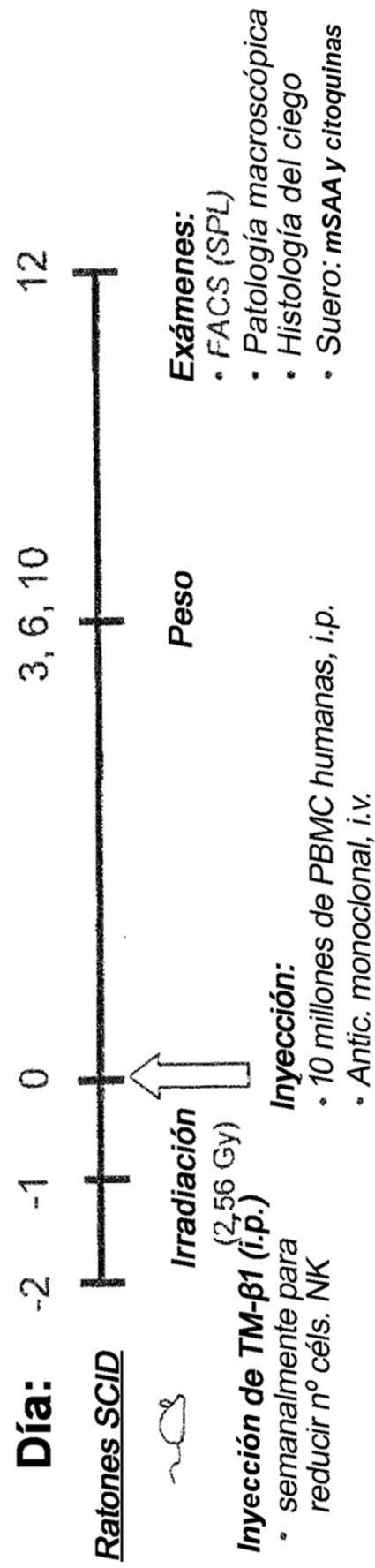


FIGURA 29

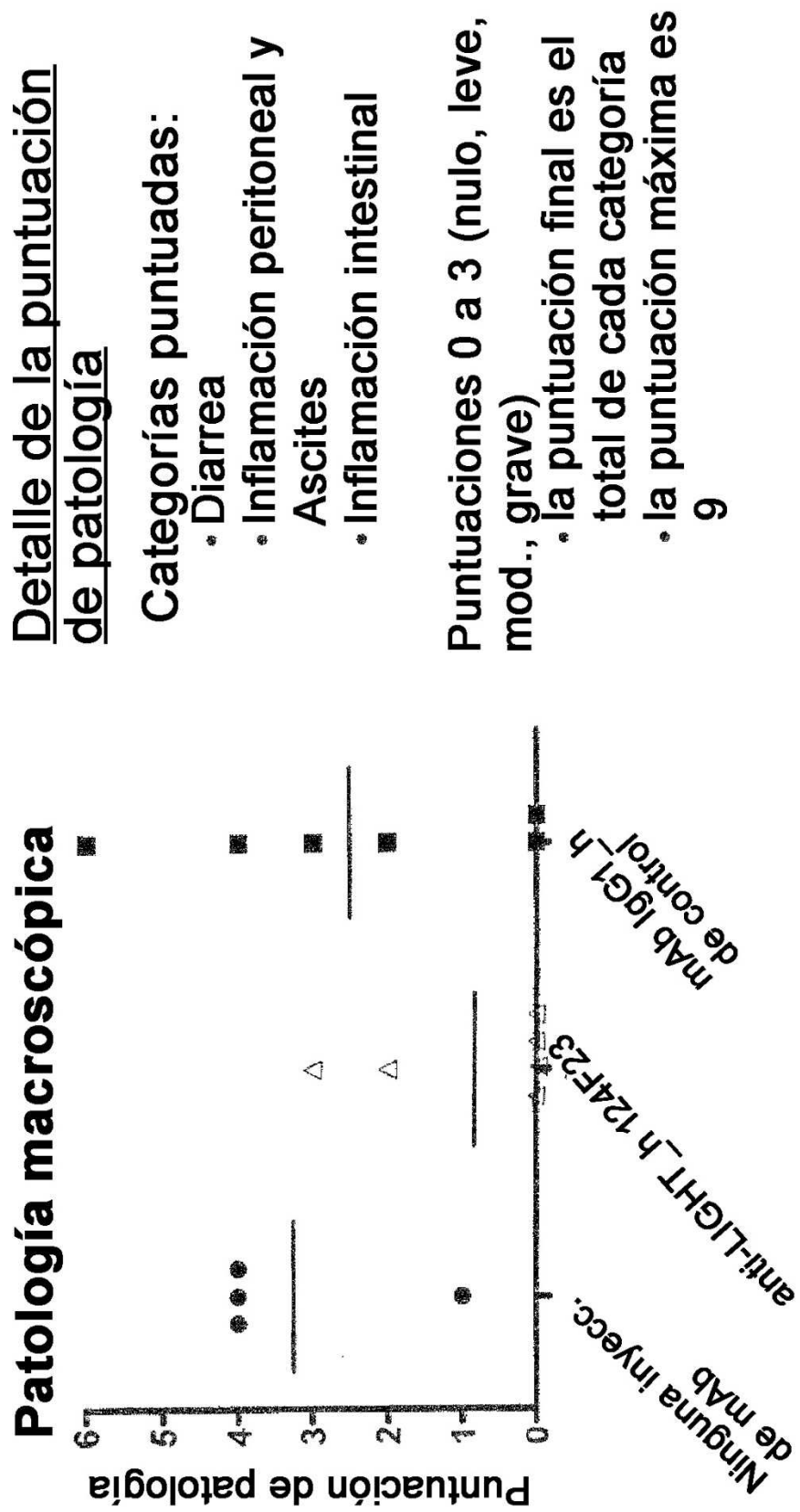


FIGURA 30

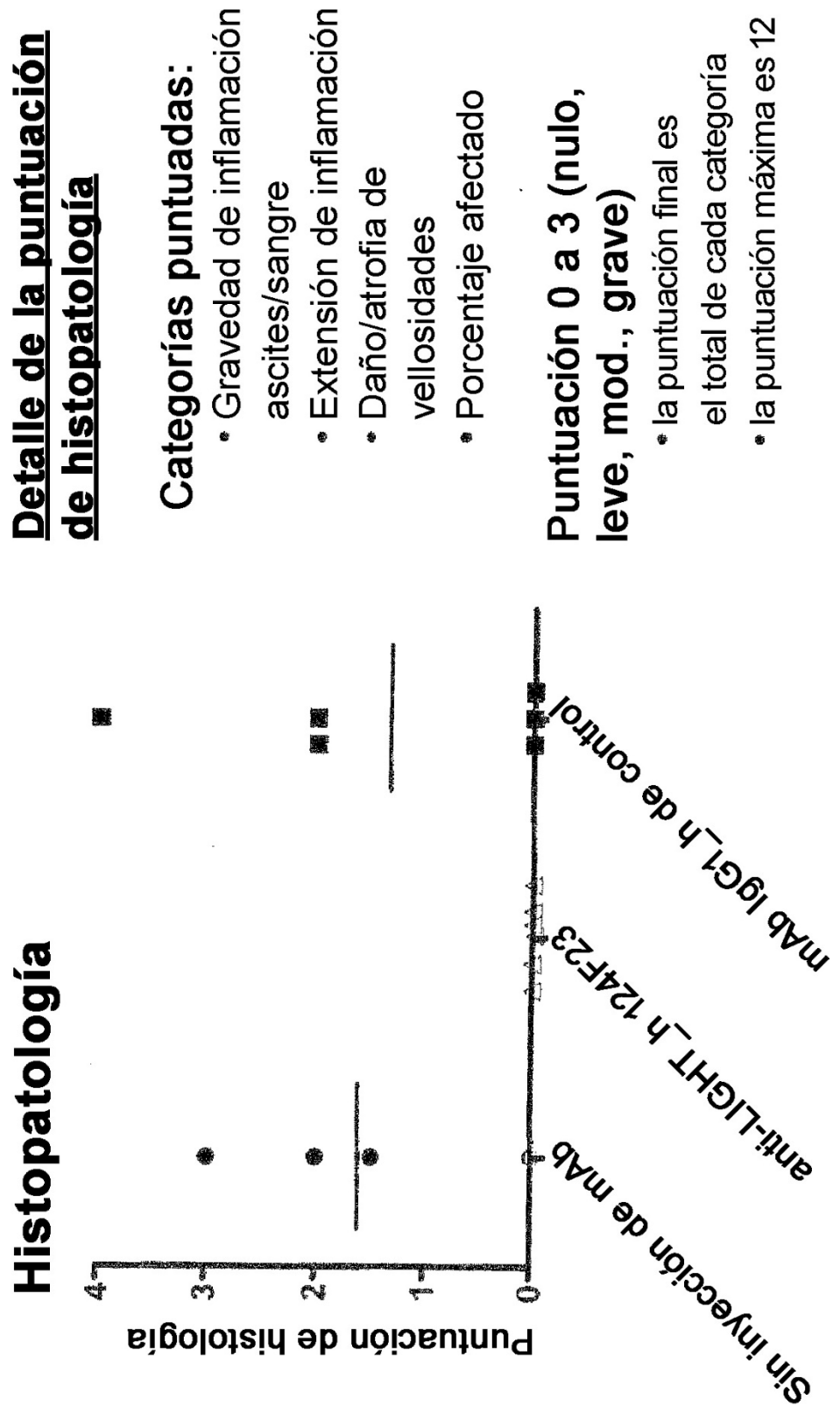


FIGURA 31

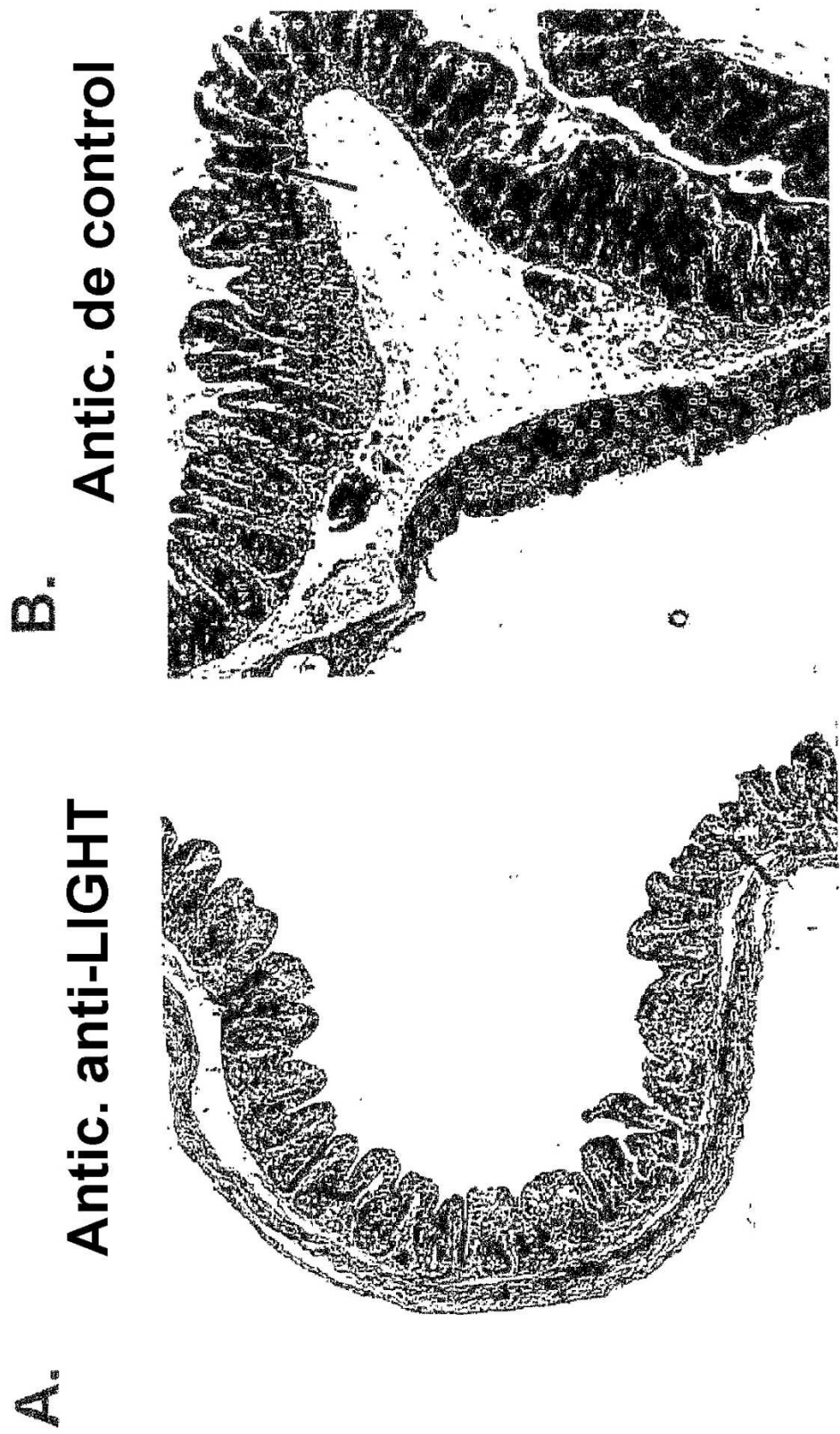


FIGURA 32

