

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 938 625**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 16/38**  
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2006 E 17206143 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2023 EP 3345927**

---

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal humano para CD134 (OX40) humana y procedimientos de preparación y utilización del mismo**

(30) Prioridad:

**25.11.2005 US 739659 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.04.2023**

(73) Titular/es:

**KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)  
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JP**

(72) Inventor/es:

**KATO, SHINICHIRO;  
SOLOFF NUGENT, RACHEL;  
YOSHIDA, HITOSHI y  
CROFT, MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 938 625 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

Anticuerpo monoclonal humano para CD134 (OX40) humana y procedimientos de preparación y utilización del mismo

5 **Introducción**

El sistema inmunitario está compuesto por múltiples tipos celulares que funcionan protegiendo al cuerpo frente a las enfermedades infecciosas. Esto depende del reconocimiento de los antígenos foráneos y de la capacidad de distinguir los propios de los extraños. En algunos casos, se rompe la barrera entre propios y extraños, conduciendo a la destrucción por el propio sistema inmunitario. Estas respuestas autoinmunitarias pueden conducir a enfermedades debilitantes, tales como la diabetes, la esclerosis múltiple y la enfermedad intestinal inflamatoria. Uno de los principales mediadores de estas respuestas autoinmunitarias es el linfocito T o célula T. Normalmente las células T son tolerantes a los autoantígenos pero en varios trastornos autoinmunitarios se pierde esta tolerancia y las células T elicitán respuestas inmunitarias contra los tejidos sanos. La eliminación de las células T autoinmunitarias o el bloqueo de la activación o supervivencia de las mismas mejora los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, esta eliminación genérica de las células T o del bloqueo de la activación de las mismas conduce a inmunosupresión en la que el paciente resulta altamente susceptible a los agentes infecciosos. Se requieren nuevas terapias con diana específicamente en las células T efectoras y que reduzcan exclusivamente 10 las células T autorreactivas.

15

20

### **Sumario**

La presente invención proporciona:

- 25
1. Un anticuerpo aislado o purificado que se une específicamente a un epítopo en una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o químico, en el que el anticuerpo comprende:
- 30      la secuencia madura de SEC ID Nº: 9, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y
- 35      la secuencia madura de SEC ID Nº: 10, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma; o
- 40      la secuencia madura de SEC ID Nº: 44, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y
- 45      la secuencia madura de SEC ID Nº: 45, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma; o
- 50      la secuencia madura de SEC ID Nº: 46, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y
- 55      la secuencia madura de SEC ID Nº: 47, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma,
- 60      o un fragmento del mismo seleccionado de entre Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv) o Fvs unidos por disulfuro (sdFv).
2. El anticuerpo, o fragmento, de [1], en el que el anticuerpo comprende:
- 65      la secuencia madura de SEC ID Nº: 9; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 9 con 1-3 sustituciones de aminoácido en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 9, y
- 70      la secuencia madura de SEC ID Nº: 10; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 10 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 10;
- 75      o
- 80      la secuencia madura de SEC ID Nº: 44; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 44 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 44, y

la secuencia madura de SEC ID Nº: 45; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 45 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 45;

- 5           o
- 10          la secuencia madura de SEC ID Nº: 46; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 46 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 46, y
- 15          la secuencia madura de SEC ID Nº: 47; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 47 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 47.
1. El anticuerpo, o fragmento, de [1] o [2], en el que el anticuerpo comprende:
- 20          la secuencia madura de SEC ID Nº: 9 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 10, o  
la secuencia madura de SEC ID Nº: 44 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 45, o  
la secuencia madura de SEC ID Nº: 46 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 47.
2. El anticuerpo, o fragmento, según uno cualquiera de [1] a [3], en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG, opcionalmente un anticuerpo IgG1.
- 25          5. El anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1] a [4], en el que el anticuerpo o fragmento presenta actividad antagonista.
- 30          6. El anticuerpo, o fragmento, según uno cualquiera de [1] a [5] en el que
- 35          a) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la unión del ligando OX40 a OX40,  
b) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la unión del ligando OX40 a las células T activadas,  
c) el anticuerpo o fragmento modula la señalización celular mediada por OX40 o modula una respuesta celular mediada por OX40,
- 40          d) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la señalización celular mediada por OX40,  
e) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene una respuesta celular mediada por OX40, en el que la respuesta celular mediada por OX40 comprende la proliferación de linfocitos, la expresión de citocinas, la supervivencia de linfocitos, la activación de NF- $\kappa$ B, el mantenimiento de la actividad de PKB (Akt), o la regulación por incremento de la supervivencia,
- 45          f) el anticuerpo o fragmento induce la lisis de las células que expresan OX40 de EL-4 humanas o células T humanas activadas mediada por linfocitos citolíticos naturales, macrófagos o neutrófilos, en el que la lisis celular específica porcentual (%) inducida a 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo o fragmento es de aproximadamente 15 a 75%, 25 a 65%, 30 a 60%, o 50-100%, o
- 50          g) el anticuerpo o fragmento reduce, disminuye o previene un síntoma de la enfermedad del injerto contra el hospedador en un modelo de enfermedad de xenoinjerto hospedador aguda o crónica, o en el que el anticuerpo o fragmento provoca una remisión o regresión de la enfermedad del injerto contra el hospedador en un modelo de enfermedad de xenoinjerto hospedador aguda o crónica.
- 55          7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1] a [6].
- 60          8. El anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1] a [6] o la composición farmacéutica según [7] para la utilización como un medicamento.
- 65          9. El anticuerpo o fragmento según uno cualquiera de [1] a [6] o la composición farmacéutica según [7] para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno seleccionada/o de entre enfermedad del injerto contra el hospedador, trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inmunitario crónica/o o aguda/o, rechazo de trasplante e inflamación.
10. El anticuerpo o fragmento o la composición farmacéutica según [9] para la utilización según [9], en el/la que la inflamación se encuentra presente en pulmón, articulación, músculo, piel, sistema nervioso central o periférico, o intestino.

11. El anticuerpo o fragmento o la composición farmacéutica según [9] para la utilización según [9], en el/la que el trastorno autoinmunitario es seleccionado de entre: artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, celiaquía, soriasis, nefritis lúpica proliferativa, miopatía granulomatosa y polimiositis.

5 La invención proporciona anticuerpos aislados o purificados que se unen específicamente a un epítopo en una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40 (por ejemplo la SEC ID nº 51). Entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos humanos, humanizados e híbridos que se unen a una secuencia de OX40 de mamífero (por ejemplo de primate o de ser humano) (por ejemplo la SEC ID nº 50). Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que presentan actividad antagonista de OX40. Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que presentan actividad agonista de OX40.

10 En unas formas de realización particulares, un anticuerpo presenta actividad antagonista de OX40 y reduce o incrementa la producción de una citocina o un interferón, la supervivencia o la proliferación de células T efectoras, 15 de memoria o reguladoras activadas, la expresión de una proteína antiapoptótica o proapoptótica. En aspectos no limitativos particulares, se selecciona una citocina de entre IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, FNT-α, interferón γ y GM-CSF y una proteína antiapoptótica o proapoptótica se selecciona de entre Bcl-xL, Bcl-2, Bad y Bim.

20 En otras formas de realización particulares de la presente divulgación, los anticuerpos de OX40 son producidos por una estirpe celular de hibridoma denominada como 112F32 (ATCC nº PTA-7217, depositada el 17 de noviembre, 2005), 112V8 (ATCC nº PTA-7219, depositada el 17 de noviembre de 2005), 112Y55 (ATCC nº PTA-7220, depositada el 17 de noviembre de 2005), 112Y131 (ATCC nº PTA-7218, depositada el 17 de noviembre de 2005), y 112Z5 (ATCC nº PTA-7216, depositada el 17 de noviembre, 2005). En unas formas de realización adicionales de la presente divulgación, los anticuerpos de OX40 pueden unirse a una secuencia de aminoácidos a la que se une el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presentan una afinidad de unión a OX40 comprendida entre aproximadamente 1 y 5.000 veces la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta una afinidad de unión para OX40 superior o inferior que un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta una afinidad de unión a OX40 comprendida entre aproximadamente KD 10<sup>-6</sup> M y aproximadamente KD 10<sup>-13</sup> M de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta la especificidad de unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; compite con un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 para la unión a OX40, inhibe o evita la unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5 a OX40, según se determinó en un ensayo ELISA (por ejemplo inhibe por lo menos 50% de la unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40) o se une al mismo epitopo que 112V8, 112Y55 e Y131, e inhibe o evita la unión de OX40 a ligandos de OX40 (OX40L) (por ejemplo en 85% o más).

40 Entre los anticuerpos adicionalmente se incluyen los que se unen específicamente a OX40 expresado sobre las células. En formas de realización particulares, el anticuerpo se une específicamente a OX40 expresado sobre células no T (por ejemplo células asesinas naturales, granulocitos, monocitos o células B), o líneas celulares transfectadas con OX40 (por ejemplo células CHO, células L929 o células HeLa). En un aspecto particular, el anticuerpo se une específicamente a células T humanas activadas, no células T en reposo.

45 Entre los anticuerpos de la presente divulgación se incluyen secuencias de región variable de cadena pesada o ligera madura, por ejemplo tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. Entre los anticuerpos se incluyen además formas modificadas y variantes, tales como sustituciones dentro o fuera de una región constante, una región determinante de complementariedad (RDC) o un anticuerpo de región de marco (RM) de una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura, por ejemplo tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. En unos aspectos particulares de la presente divulgación, las sustituciones incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos. En unos aspectos particulares adicionales de la presente divulgación, las sustituciones incluyen sustituciones de aminoácidos de entre 1 y 3, de entre 3 y 5, de entre 5 y 10 o más residuos aminoácidos. Un anticuerpo puede presentar una identidad de 80% a 85%, de 85% a 90%, de 90% a 95%, de 96%, de 97%, 98%, de 99% o más respecto a una secuencia de una región variable de cadena pesada o ligera madura tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49.

50 Los anticuerpos incluyen además subsecuencias de una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura, por ejemplo tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. En aspectos particulares, se selecciona una subsecuencia de entre Fab, Fab', F(ab') 2, Fv, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv unido por disulfuro (sdFv) y V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>.

55 Los anticuerpos incluyen además dominios heterólogos. En aspectos particulares, entre los dominios heterólogos se incluyen una etiqueta, un marcaje detectable o un agente citotóxico.

- Los anticuerpos modificados y variantes, tales como sustituciones, subsecuencias y adiciones pueden conservar una actividad detectable de un anticuerpo OX40 tal como se indica en la presente memoria. En una forma de realización de la presente divulgación, un anticuerpo modificado conserva una actividad detectable de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En otra forma de realización, un anticuerpo modificado modula la expansión o supervivencia de las células T, o el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, o eliminar las células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En unos aspectos particulares, un anticuerpo modificado inhibe la señalización de OX40 o reducir o eliminar el número de células T autorreactivas específicas para un autoantígeno (por ejemplo un autoantígeno tal como la proteína básica de mielina, la glucoproteína de mielina del oligodendrocito, la proteína del proteolípido, el colágeno, antígenos del tejido articular sinovial, la insulina, ácido glutámico descarboxilasa, antígenos intestinales, antígenos del tiroides, proteínas histonas, antígenos musculares y antígenos de la piel).
- Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que compiten o no compiten con la unión de un anticuerpo L106 a OX40. En una forma de realización particular, un anticuerpo no inhibe o evita la unión del anticuerpo L106 a OX40, determinada mediante un ensayo ELISA.
- Entre los anticuerpos se incluyen además los que afectan a una función o actividad de OX40. En formas de realización particulares, un anticuerpo inhibe o evita la unión de ligando de OX40 a OX40, inhibe o evita la unión de ligando de OX40 a células T activadas, modula una respuesta celular mediada por OX40 o la señalización celular mediada por OX40 (por ejemplo inhibe o bloquea). En aspectos particulares, una respuesta celular mediada por OX40 comprende la proliferación de linfocitos, la expresión de citocinas, la supervivencia de linfocitos, la activación de NF- $\kappa$ B, el mantenimiento de actividad de PKB (Akt) o la regulación positiva de la survivina. En formas de realización adicionales, un anticuerpo induce la lisis de células EL4 expresantes de OX40 humano o células T humanas activadas mediadas por células asesinas naturales, macrófagos o neutrófilos, por ejemplo el porcentaje (%) de lisis celular específica inducida con una concentración de 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo es de aproximadamente 15% a 75%, de 25% a 65%, de 30% a 60%, o de 50% a 100%.
- Entre los anticuerpos se incluyen además aquellos que presentan una función o actividad *in vivo*. En formas de realización particulares, un anticuerpo reduce, disminuye o previene un síntoma de enfermedad de injerto contra huésped en un modelo de enfermedad de xenoinjerto-huésped aguda o crónica (por ejemplo ratones inmunodeficientes (SCID) que han recibido células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas tras la administración de anticuerpo anti-IL2R cadena beta y una dosis subletal de irradiación). En aspectos particulares, un síntoma de enfermedad de injerto contra huésped es la pérdida de peso, la pérdida de pelo, erupciones en la piel, hematuria, hidroperitoneo e infiltrados celulares inflamatorios en el hígado, tracto intestinal, pulmón o la piel, o la muerte.
- En formas de realización adicionales, un anticuerpo reduce, disminuye o previene la inflamación en el pulmón, la piel o el intestino, o reduce, disminuye o evita un síntoma de un trastorno autoinmunitario. En aspectos particulares, un anticuerpo reduce o previene un síntoma de la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes, la enfermedad de Crohn, la enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis ulcerosa, la enfermedad celiaca, la soriasis, la nefritis del lupus proliferativa, la miopatía granulomatosa o la polimiositis.
- Entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, cualesquiera isotipos o subclases de los mismos. En aspectos particulares, el anticuerpo es un isotipo IgG (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA, IgM, IgE o IgD.
- También pueden incluirse anticuerpos en composiciones farmacéuticas. En una forma de realización, un anticuerpo incluye un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Los anticuerpos pueden estar codificados por secuencias de ácidos nucleicos. En una forma de realización de la presente divulgación, un ácido nucleico codifica una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura, por ejemplo tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49, o una subsecuencia de la misma. En aspectos particulares, entre las secuencias de ácidos nucleicos se incluyen SEC ID nº 3 a nº 6 y SEC ID nº 38 a nº 43, o secuencias degeneradas con respecto a SEC ID nº 3 a nº 6 y SEC ID nº 38 a nº 43. En unos aspectos particulares adicionales de la presente divulgación, un ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que presenta uno o más residuos aminoácidos sustituidos, añadidos o delecionados de secuencia de región variable de cadena pesada o ligera, tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. En unos aspectos particulares adicionales de la presente divulgación, un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que presenta uno o más residuos aminoácidos sustituidos, añadidos o delecionados de secuencia de región variable de cadena pesada o ligera, tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49, presenta una actividad de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 (por ejemplo presenta afinidad de unión para un epítopo del dominio extracelular de OX40). En aspectos particulares todavía adicionales, la secuencia de ácidos nucleicos incluye una secuencia de control de la expresión o un vector.

- Los anticuerpos pueden ser producidos por células hospedadoras y células aisladas. En formas de realización particulares, una célula hospedadora o aislada es una célula de hibridoma o una célula CHO. En una forma de realización particular adicional de la presente divulgación, una célula aislada expresa un anticuerpo que presenta especificidad de unión como anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5.
- La divulgación proporciona kits. En formas de realización particulares de la divulgación, un kit incluye un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5, e instrucciones para administrar el anticuerpo en un sujeto que requiere tratamiento con el anticuerpo.
- La divulgación proporciona procedimientos in vivo, incluyendo procedimientos de tratamiento y terapéuticos. En unas formas de realización particulares de la divulgación, un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, o un síntoma de una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo en un sujeto que requiere tratamiento incluye la administración en el sujeto de un anticuerpo o de una composición farmacéutica eficaz para tratar la enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, o un síntoma de la enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo en el sujeto. En unos aspectos particulares de la divulgación, el tratamiento resulta en el alivio o mejora de uno o más síntomas adversos o consecuencias físicas asociadas a una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo.
- En unas formas de realización adicionales de la divulgación, un procedimiento para tratar una enfermedad de injerto contra el huésped incluye la administración en el sujeto que requiere de tratamiento de un anticuerpo o una composición farmacéutica eficaz para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped. En unos aspectos particulares de la divulgación, el tratamiento reduce, disminuye o previene la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversas asociadas a la enfermedad del injerto contra el huésped (por ejemplo la pérdida de peso, la pérdida de pelo, erupciones cutáneas, hematuria, hidroperitoneo, infiltrados celulares inflamatorios en el hígado, tracto intestinal o pulmón, o la muerte), resulta en una remisión o regresión de la enfermedad del injerto contra el huésped, o resulta en que se evita la enfermedad del injerto contra el huésped. En aspectos adicionales de la divulgación, un injerto puede incluir médula ósea, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica o células madre de sangre del cordón.
- En unas formas de realización particulares de la divulgación, un procedimiento para tratar el rechazo del trasplante incluye la administración en un sujeto que requiere de tratamiento de un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para tratar el rechazo del trasplante. En unos aspectos particulares de la divulgación, el tratamiento reduce, disminuye o previene la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversos asociadas al rechazo del trasplante (por ejemplo una respuesta inmunitaria contra el trasplante o la destrucción de células o tejido del trasplante), resulta en una remisión o regresión del rechazo del trasplante, o resulta en el bloqueo del rechazo del trasplante. En unos aspectos adicionales de la divulgación, un trasplante puede incluir células, tejido u órgano de riñón, corazón o páncreas.
- En unas formas de realización todavía más particulares de la divulgación, un procedimiento para reducir, disminuir o prevenir la inflamación incluye la administración en un sujeto que requiere del tratamiento de un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para reducir, disminuir o impedir la aparición, frecuencia, duración o gravedad de la inflamación. En unos aspectos particulares de la divulgación, la inflamación se encuentra presente en el pulmón, articulaciones, músculos, piel, sistema nervioso central o periférico, o intestino. En unos aspectos adicionales de la divulgación, un tratamiento da como resultado la reducción de la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversos asociados a inflamación.
- En todavía unas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, un procedimiento para tratar un trastorno autoinmunitario incluye administrar en el sujeto que requiere de un tratamiento un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para reducir, disminuir o impedir la aparición, frecuencia, duración o gravedad de un síntoma de un trastorno autoinmunitario. En unos aspectos particulares de la divulgación, el trastorno autoinmunitario incluye artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, soriasis, nefritis lúpica proliferativa, miopatía granulomatosa o polimiositis. En unos aspectos adicionales de la divulgación, un tratamiento da como resultado la reducción, disminución o bloqueo de la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversos asociados a un trastorno autoinmunitario.
- Entre los procedimientos adicionales que pueden resultar en el tratamiento o la terapia, al ponerlos en práctica in vivo, se incluyen la modulación de la actividad o función de OX40. En unas formas de realización particulares de la divulgación, un procedimiento para inhibir o bloquear una respuesta celular mediada por OX40 incluye la administración en un sujeto que requiere de la inhibición o bloqueo de una respuesta celular mediada por OX40 de un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para inhibir o bloquear una respuesta celular mediada por OX40 (por ejemplo la proliferación de linfocitos, la expresión de citocinas o la supervivencia de los linfocitos). En unas formas de realización adicionales de la divulgación, un procedimiento para inhibir o bloquear la unión de un ligando de OX40 a células T activadas incluye la administración en el sujeto que requiere el bloqueo, inhibición o prevención de la unión de un ligando de OX40 a células T activadas de un anticuerpo o composición farmacéutica

- eficaz para inhibir o impedir la unión de un ligando de OX40 a las células T activadas. En unas formas de realización adicionales de la divulgación, un procedimiento para inhibir o bloquear la unión de un ligando de OX40 a OX40 incluye la administración en un sujeto que requiere el bloqueo, la inhibición o la prevención de la unión de n ligando de OX40 a OX40 de un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para inhibir o evitar la unión de un ligando de OX40 a OX40. En todavía otras formas de realización particulares de la divulgación, un procedimiento para modular la señalización celular mediada por OX40 incluye la administración en un sujeto que requiere la modulación de la señalización celular mediada por OX40 de un anticuerpo o composición farmacéutica eficaz para modular la señalización celular mediada por OX40. En todavía unas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, un procedimiento para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas incluye la administración en un sujeto que requiere la reducción del número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas de una cantidad de anticuerpo suficiente para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas.
- En todavía unas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, un procedimiento para reducir el número de células T activadas en la sangre, bazo, nódulos linfáticos, intestinos, hígado, pulmón o piel en un modelo de enfermedad de injerto contra huésped aguda o crónica incluye la administración de una cantidad de anticuerpo en el modelo de enfermedad de xenoinjerto contra huésped aguda o crónica suficiente para reducir el número de células T activadas en la sangre, bazo, nódulos linfáticos, intestinos, hígado, pulmón o piel.
- En todavía unas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno causado por las células T activadas, efectoras, de memoria o reguladoras incluye la administración en un sujeto de una cantidad de anticuerpo suficiente para reducir, disminuir o impedir la progresión de la enfermedad o trastorno causado por células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, o para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En unos aspectos particulares, las enfermedades o trastornos incluyen la enfermedad del injerto contra el huésped, la inflamación o un trastorno autoinmunitario.
- Entre los sujetos tratables se incluyen mamíferos (por ejemplo seres humanos). En unas formas de realización particulares, un sujeto que es un candidato para el tratamiento o que ha sido tratado para una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo; un sujeto que es un candidato para un tratamiento o que ha sido tratado para enfermedad del injerto contra el huésped; un sujeto que es un candidato para un tratamiento o que ha sido tratado para rechazo del trasplante; un sujeto que es un candidato para un tratamiento o que ha sido tratado para inflamación, o un sujeto que es un candidato para el tratamiento o que ha sido tratado para un trastorno autoinmunitario; un sujeto es un candidato para el tratamiento o que ha sido tratado para una respuesta celular mediada por OX40.
- Los procedimientos de la divulgación que incluyen la administración o dosificación de anticuerpos de OX40 pueden ponerse en práctica mediante cualquier procedimiento aceptable. En unas formas de realización particulares, un anticuerpo de OX40 se administra en el sujeto por vía local, regional o sistémica.
- La divulgación proporciona asimismo procedimientos para producir anticuerpos de OX40 humanos que presentan actividad antagonista de OX40. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye administrar un dominio extracelular de OX40 humano conjugado con proteína Fc recombinante humana o células T humanas activadas en un animal capaz de expresar la inmunoglobulina humana (por ejemplo un ratón transgénico o una vaca transgénica); cribar el animal para la expresión del anticuerpo de OX40 humano; seleccionar un animal que produce un anticuerpo de OX40 humano; aislar un anticuerpo a partir del animal seleccionado, y determinar si el anticuerpo de OX40 humano presenta actividad antagonista de OX40.
- La divulgación proporciona además unos procedimientos para producir anticuerpos de OX40 humanos que inhiben o impiden la unión de OX40 a ligando de OX40 (OX40L). En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye administrar un dominio extracelular de OX40 humano conjugado con proteína Fc recombinante humana o células T humanas activadas en un animal capaz de expresar inmunoglobulinas humanas (por ejemplo un ratón transgénico o una vaca transgénica); cribar el animal para la expresión de anticuerpo de OX40 humano; seleccionar un animal que produce un anticuerpo de OX40 humano; aislar un anticuerpo a partir del animal seleccionado, y determinar si el anticuerpo de OX40 humano inhibe o impide la unión de OX40 a ligando de OX40 (OX40L).
- La divulgación proporciona además animales transgénicos no humanos que expresan un anticuerpo de OX40. En varias formas de realización de la divulgación, el anticuerpo de OX40 expresado es idéntico a un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; se une a un epítopo en una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40 del anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta una afinidad de unión de OX40 de entre aproximadamente 1 y 5.000 veces la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta una afinidad de unión de OX40 de entre aproximadamente KD 10<sup>-6</sup> M y aproximadamente KD 10<sup>-12</sup> M de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; presenta la especificidad de unión

de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5; o compite con un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5 para la unión a OX40.

## 5    Descripciones de los dibujos

figuras 1A-F: análisis de citometría de flujo con anticuerpos humanos anti-OX40 humano. A. Perfil de dispersión directa frente al de dispersión lateral de células T CD4 humanas tras tres días de estimulación con PHA e IL2.

10      B-F. Células T humanas activadas marcadas con anticuerpos humanos anti-OX40 humano o controles. La línea gruesa representa la tinción sobre las células en el canal activado, mientras que la línea delgada representa las células en el canal de en reposo. El marcaje de las células activadas con los anticuerpos IgG de isotipo de control se muestra mediante la línea de puntos en los histogramas. B. 112F32, C. 112V8, D. 112Y55, E. 112Y131, y F. 112Z5.

15      figura 2: tinción de células T humanas activadas por anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40 humano. Los datos de media geométrica de intensidad de fluorescencia presentados se han obtenido de un canal de células T activadas similar al ilustrado en la figura 1A. Estos datos se utilizaron para determinar la KD y BMAX mostradas en la tabla 3.

20      figuras 3A-B: cinco anticuerpos de OX40 compiten para la unión a OX40. A. Porcentaje de inhibición de Fc\_m:OX40\_h a anticuerpo recubierto detectado con anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP. B. Porcentaje de inhibición de OX40\_h:Fc\_h unido a anticuerpo de ratón detectado con anticuerpo de oveja anti-IgG humano-HRP. No se muestran los números negativos.

25      figuras 4A-B: cinco anticuerpos de OX40 compiten para la unión a OX40. A. Porcentaje de inhibición de células T activadas teñidas con anticuerpos bloqueantes y anticuerpos anti-OX40 biotinilados detectados con SA-PE. B. Porcentaje de inhibición de células T humanas activadas marcadas con anticuerpos de ratón anti-OX40 humano y anticuerpos anti-OX40 biotinilados detectados con SA-PE. No se muestran los números negativos.

30      figura 5A-B: bloqueo de la unión de OX40L a OX40 por anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40 humano medido mediante ELISA y citometría de flujo. A. El porcentaje de inhibición del ligando unido se detectó con anticuerpo secundario anti-FLAG-HRP mediante ELISA. B. El porcentaje de unión de OX40L unido se detectó con anticuerpo anti-FLAG-PE mediante citometría de flujo.

35      figuras 6A-C: los paneles A-C representan tres estudios con tres diferentes parejas de donantes e ilustran el efecto de los anticuerpos anti-OX40 sobre la proliferación de las células T.

40      figuras 7A-C: el anticuerpo recombinante 112V8G1 mejoró la enfermedad del injerto contra el huésped xenogénica aguda. A. Puntuación total de patología macroscópica. B. Suspensiones de células individuales de los bazos analizados mediante citometría de flujo para la presencia de células T humanas. Se muestra el número medio de células T y la desviación estándar de cada población en cada grupo de tratamiento. C. Se midió el interferón gamma humano en el suero de los ratones. Se muestra la cantidad media de interferón gamma en pg/ml para cada grupo de ratones más la desviación estándar.

45      figuras 8A-C: el anticuerpo 112V8G1 mejora la enfermedad del injerto contra el huésped xenogénica crónica. A. Puntuaciones totales de patología macroscópica de ratones individuales. B. Número medio de células T humanas en los bazos de ratones más la desviación estándar determinados mediante citometría de flujo. C. Número medio de células T humanas en los nódulos linfáticos periféricos de ratones SCID el día cuarenta y ocho después de la transferencia de las células T CD4.

50      figuras 9A-C: el anticuerpo 112V8G4PE mejora la enfermedad del injerto contra el huésped xenogénica aguda al administrarlo el día 0, 3 o 6. A. Puntuaciones totales de patología macroscópica de ratones individuales tratados el día 0. B. Número medio de células T humanas en los bazos el día 12 de ratones tratados el día 0 más la desviación estándar del grupo. C. Puntuaciones totales de patología macroscópica de ratones individuales tratados el día 3 o el día 6.

55      figura 10: porcentaje de lisis específica por anticuerpos IgG1 humanos anti-OX40 humano. Los anticuerpos IgG1 humanos anti-OX40 humanos median en la ADCC de dianas OX40 humana de EL4.

## 60    Descripción detallada

65      La invención se basa por lo menos en parte en anticuerpos que se unen específicamente a OX40 (CD134), que pueden denominarse, por ejemplo, anticuerpos de OX40, anti-OX40 o anticuerpos anti-OX40. Entre los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a OX40 se incluyen los anticuerpos anti-OX40 de mamífero (humanos, de primate, etc.), humanizados e híbridos. Entre los anticuerpos de la invención y sussecuencias

(fragmentos) de anticuerpo que se unen específicamente a OX40 se incluyen anticuerpos purificados y aislados, así como formulaciones farmacéuticas de los mismos.

La OX40 es una glucoproteína de 50 kilodaltons (kDa) y un elemento de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (SFRFNT). El ligando de OX40, OX40L (también denominado SFFNT4, CD252) se ha informado que se expresa sobre las células endoteliales, las células presentadoras de antígeno activadas, entre ellas macrófagos, células dendríticas, células B y células asesinas naturales. Aunque sin respaldo teórico, la unión entre CD40 sobre las células presentadoras de antígeno incrementa la expresión de OX40L al igual que los lipopolisacáridos (LPS). La expresión de OX40 sobre las células T puede inducirse tras la señalización mediante el receptor de antígeno de células T. Por ejemplo, OX40 se expresa sobre células T recientemente activadas en el sitio de inflamación. Las células T CD4 y CD8 puede regular positivamente OX40 bajo condiciones inflamatorias.

La OX40 también se denomina CD134, SFRFNT4, ACT35 y TXGP1L. El término OX40 también incluye las formas de mamífero (por ejemplo de primate y humanas) de OX40. Por lo tanto, entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen anticuerpos que se unen específicamente a secuencias de OX40 de mamífero, tales como OX40 humano. Entre las secuencias de OX40 tales como OX40 humano se incluyen las variantes polimórficas. Un ejemplo no limitativo de un OX40 humano de longitud completa es la secuencia siguiente:

```
MCVGARRLGRGPCAALLLGLSLTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHERC RPGNG
MVSRCRSQNTVCRPCPGFYNDVSSKPKCPTWCNLRSRKQLCTATQDTVC
RCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCLAGKHTLQPASN SSD
AICEDRDPPATQPQETQGPPARPI TVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGL
GLVLGLLGPLAILALYLLRRDQRLLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
```

(SEC ID nº 50).

Los anticuerpos de OX40, anti-OX40 y anticuerpos anti-OX40 se refieren a anticuerpos que se unen específicamente a OX40. La unión específica es aquella unión que es selectiva para un epítopo presente en OX40. La unión específica puede distinguirse de la unión no específica utilizando ensayos conocidos de la técnica (por ejemplo la inmunoprecipitación, ELISA, citometría de flujo y transferencia western).

Los anticuerpos de OX40 pueden unirse a diferentes proteínas en el caso de que la totalidad o una parte de un epítopo antigenético al que se une específicamente el anticuerpo se encuentre presente en una proteína diferente. De esta manera, dependiendo del grado de homología de secuencia o estructural del epítopo de OX40, un anticuerpo de OX40 puede unirse específicamente a otra proteína que presenta una homología de secuencia o estructural elevada respecto al epítopo de OX40. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos de OX40 pueden unirse a diferentes proteínas en el caso de que un epítopo de suficiente homología de secuencia o estructural se encuentre presente en una proteína diferente.

Entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen anticuerpos aislados y purificados. Los anticuerpos de la invención, incluyendo los anticuerpos de OX40 aislados o purificados, por lo tanto, no incluyen los de seres humanos.

El término "aislado" utilizado como modificador de una composición se refiere a que la composición se prepara mediante la mano del hombre o se separa de otro u otros componentes en un medio *in vivo* natural, típicamente mediante una o más etapas o procedimientos de manipulación. Generalmente, las composiciones separadas de esta manera se encuentran sustancialmente libres de uno o más materiales con los que se encuentran asociados normalmente de manera natural, por ejemplo uno o más de entre proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y membranas celulares. De esta manera, una composición aislada se separa de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que la composición se encuentra presente naturalmente, o del medio artificial en el que se produce (por ejemplo sintéticamente o mediante cultivo celular). Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo de OX40 aislado de un animal en el que se produce el anticuerpo (por ejemplo un mamífero no transgénico o un mamífero transgénico, tal como un roedor (ratón) o un animal ungulado (bovino)) y se separa de otros polipeptídicos y ácidos nucleicos. De esta manera, el suero que contiene el anticuerpo obtenido del animal se considera aislado. El término "aislado" no excluye formas físicas alternativas, por ejemplo un anticuerpo aislado podría incluir subsecuencias, quimeras, multímeros o formas derivatizadas de anticuerpos.

El término "purificado" utilizado como modificador de una composición se refiere a una composición libre de la mayoría o sustancialmente la totalidad de los materiales con los que se encuentra asociado típicamente de manera natural. Los anticuerpos purificados típicamente se separan de los componentes presentes naturalmente en el medio de los anticuerpos. De esta manera, un sobrenadante de anticuerpos separado del cultivo celular de hibridoma productor de anticuerpos se considera purificado. Por lo tanto, purificado no requiere la pureza absoluta y es específico del contexto. Además, una composición "purificada" puede combinarse con otra u otras moléculas. De esta manera, el término "purificado" no excluye las combinaciones de composiciones. La pureza puede

determinarse mediante cualquier procedimiento apropiado, incluyendo, por ejemplo, la espectroscopía de UV, la cromatografía (por ejemplo la HPLC, la fase gaseosa), la electroforesis en gel (por ejemplo la tinción de plata o de Coomassie) y el análisis de secuencias (peptídicas y de ácidos nucleicos).

- 5 Entre las proteínas y ácidos nucleicos "purificados" se incluyen las proteínas y ácidos nucleicos producidos mediante procedimientos de purificación estándares. El término incluye además las proteínas y ácidos nucleicos producidos mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como mediante síntesis química. El término "purificado" puede referirse además a una composición en la que el nivel de contaminantes es inferior a un nivel que es considerado aceptable para una agencia reguladora para la administración en un ser humano o animal no humano, por ejemplo la Food and Drug Administration (FDA).

10 Entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo en una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40. En formas de realización particulares, los anticuerpos de OX40 ejemplificativos se unen específicamente a tres "epítopenos" sobre OX40, tal como se determina en un ensayo de bloqueo cruzado. Una secuencia ejemplificativa no limitativa del dominio extracelular de la OX40 humana se establece como:

15 MCVGARRLLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG  
 20 FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTCR CR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA  
 CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPS (SEC ID nº 51).

25 Los epítopenos de péptidos típicamente son secuencias cortas de aminoácidos, por ejemplo de una longitud de entre aproximadamente cinco y 15 aminoácidos. Las técnicas para identificar los epítopenos son conocidas de la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente US nº 4.708.871. Brevemente, puede sintetizarse un conjunto de oligopéptidos solapantes derivados del polipéptido OX40 y unirse a una matriz fase sólida de puntas, con un oligopéptido único en cada punta. La matriz de puntas puede comprender una placa de microtitulación de 96 pocillos, permitiendo someter a ensayo 96 oligopéptidos simultáneamente. Pueden identificarse epítopenos discontinuos de manera similar utilizando escaneos de péptidos altamente solapantes de diferentes longitudes (por ejemplo 6-meros a 15-meros) inmovilizados a alta densidad sobre una membrana de soporte. Se utilizan concentraciones de anticuerpos elevadas y la unión se detecta mediante inmunodetección indirecta. En el caso de que se identifiquen múltiples secuencias de unión y se encuentran separadas por secuencias intermedias pero no se reconocen los péptidos individuales, en ese caso se ha identificado un epítopo discontinuo. Las secuencias separadas se esperaría que formasen un área continua sobre la superficie de la proteína diana y representan un epítopo conformacional (Reineke et al., Protein Sci. 7:951, 1998). Alternativamente, los kits de biblioteca de péptidos de expresión fágica (New England BioLabs) se encuentran disponibles comercialmente para el mapeado de epítopenos. Estos procedimientos y otros pueden utilizarse para determinar la afinidad de unión de cada posible subgrupo de aminoácidos consecutivos con el fin de identificar el epítopo al que se une un anticuerpo particular.

30 Los epítopenos también pueden identificarse mediante inferencia en el caso de que se utilicen secuencias peptídicas de longitud de epítopo para inmunizar animales a partir de los que se obtienen los anticuerpos que se unen a la secuencia peptídica. También pueden predecirse los epítopenos continuos utilizando programas informáticos tales como BEPIPOPE (Odorico et al., J. Mol. Recognit. 16:20, 2003).

35 40 Los anticuerpos de la invención con moléculas de inmunoglobulina monoclonal o policlonal que pertenecen a cualquier clase de anticuerpo, tal como IgM, IgG, IgA, IgE, IgD y cualquier subclase de las mismas. Son subclases ejemplificativas de IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Un anticuerpo "monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se basa en, se ha obtenido de o se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clón eucariótico, procariótico o fágico. Por lo tanto, un anticuerpo "monoclonal" se define estructuralmente y no por el procedimiento mediante el que se produce.

45 50 Los anticuerpos ejemplificativos particulares que se unen específicamente a OX40 se denominan 112F32 (ATCC nº PTA-7217, depositado el 17 de noviembre, 2005) 112V8 (ATCC nº PTA-7219, depositado el 17 de noviembre de 2005), 112Y55 (ATCC nº PTA-7220, depositado el 17 de noviembre de 2005), 112Y131 (ATCC nº PTA-7218, depositado el 17 de noviembre de 2005), y 112Z5 (ATCC nº PTA-7216, depositado el 17 de noviembre, 2005) que son anticuerpo monoclonales anti-OX40 humano (anticuerpos humanos que se unen a OX40 humano). Los anticuerpos de OX40 de la divulgación ejemplificativos 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131, y 112Z5 presentan secuencias de región variable de cadena pesada o ligera madura tal como se muestran en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. La denominación de 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5 puede referirse al anticuerpo o a la estirpe celular (por ejemplo el hibridoma, célula CHO u otra célula hospedadora) que produce el anticuerpo de OX40.

55 60 Se produjeron anticuerpo humanos anti-OX40 humano de la invención ejemplificativos utilizando ratones trans-cromosómicos (KM mice™) (documentos nº WO 02/43478, nº WO 02/092812 e Ishida et al., IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, resumen (2000)) inmunizados con diversas formas de OX40 humano recombinante soluble (IgG1\_h-OX40), proteína de fusión (OX40\_h:Fc\_h) o células T humanas activadas que expresan OX40. Se identificaron anticuerpos ejemplificativos que marcaban específicamente células T humanas activadas y no células

T en reposo. Los anticuerpos ejemplificativos tiñeron detectablemente las líneas celulares establemente transfectadas con OX40, EL4-OX40 y CHO-OX40, y no las líneas celulares parentales no transformadas, indicando que los anticuerpos se unen específicamente a OX40 humano. Los anticuerpos ejemplificativos también se unen a OX40 de macaco rhesus y a OX40 de macaco Cynomolgus, pero no se unen detectablemente a OX40 murino.

- 5 Los anticuerpos de la invención pueden presentar secuencias de cadena ligera kappa o lambda, de longitud completa como en los anticuerpos naturales, mezclas de los mismos (es decir, fusiones de secuencias de cadena kappa y lambda) y subsecuencias/fragmentos de los mismos. Las moléculas de anticuerpo naturales contienen dos cadenas ligeras kappa o dos cadenas ligera lambda.
- 10 Entre los anticuerpos de OX40 de la divulgación también se incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a una secuencia de aminoácidos a la que se une el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32 (ATCC nº PTA-7217, depositada el 17 de noviembre de 2005), 112V8 (ATCC nº PTA-7219, depositada el 17 de noviembre de 2005), 112Y131 (ATCC nº PTA-7218, depositada el 17 de noviembre de 2005), 112Y55 (ATCC nº PTA-7220, depositada el 17 de noviembre de 2005) o 112Z5 (ATCC nº PTA-7216, depositada el 17 de noviembre de 2005). Entre los anticuerpos de OX40 de la divulgación se incluyen además, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a un dominio extracelular de OX40 al que se une un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. Entre los anticuerpos de OX40 de la divulgación se incluyen adicionalmente, por ejemplo, anticuerpos que presentan la especificidad de unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. Dichos anticuerpos de OX40 típicamente muestran un bloqueo, reducción o inhibición parcial o completa de la unión del anticuerpo 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Los anticuerpos de OX40 que se unen específicamente a una secuencia de aminoácidos a la que se une el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, y los anticuerpos con la especificidad de unión del anticuerpo 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 pueden identificarse utilizando ensayos de unión competitiva. Pueden seleccionarse los anticuerpos basándose en la capacidad de competir para la unión del anticuerpo 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40. La capacidad de un anticuerpo de competir para la unión del anticuerpo 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40, o de inhibir, reducir, disminuir, impedir o bloquear la unión del anticuerpo 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40 puede determinarse mediante diversos ensayos conocidos de la técnica, incluyendo el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). En unos aspectos particulares, un anticuerpo de la divulgación inhibe la unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominado 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5 a OX40, tal como se determina en un ensayo de ELISA. En unos aspectos adicionales de la divulgación, un anticuerpo inhibe por lo menos 50% de la unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 a OX40, tal como se determina en un ensayo ELISA.
- Entre los anticuerpos de OX40 de la invención también se incluyen los anticuerpos que se unen específicamente a OX40 y que no impiden o bloquean la unión del anticuerpo de ratón anti-OX40 humano L106 (Becton Dickinson, número de catálogo 340420) a OX40. Se incluyen además los anticuerpos de OX40 que se unen específicamente a OX40 y que no inhiben, reducen o disminuyen la unión del anticuerpo L106 a OX40. El anticuerpo L106 se describe en, por ejemplo, la patente US nº 6.277.962, el documento nº WO 95/12673 y Schlossman et al., editores (Leukocyte typing V:White Cell Differentiation Antigens, Oxford: Oxford University Press, páginas 1157-60, 1995).
- Entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen los anticuerpos que se unen específicamente a OX40 que presentan una afinidad una mayor o menor afinidad para OX40 que el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. Por ejemplo, se proporcionan anticuerpos con una afinidad de unión a OX40 comprendida entre aproximadamente 1 y 10.000 veces (por ejemplo con una afinidad 2 a 5, 5 a 10, 10 a 100, 100 a 1.000 o 1.000 a 10.000 veces superior o inferior, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichos valores) la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. Por lo tanto, los anticuerpos de OX40 de la invención también incluyen anticuerpos con una afinidad de unión a OX40 superior o inferior a la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En las formas de realización particulares, un anticuerpo de OX40 de la invención presenta una afinidad de unión a OX40 con una KD de entre  $10^{-6}$  M y aproximadamente  $10^{-13}$  M, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichos valores, de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5.
- La afinidad de unión puede determinarse mediante las tasas de asociación ( $K_a$ ) y de disociación ( $K_d$ ). La constante de afinidad en el equilibrio, KD, es el cociente  $K_a/K_d$ . Las tasas de asociación ( $K_a$ ) y de disociación ( $K_d$ ) pueden medirse utilizando la resonancia del plasmón superficial (RPS) (Rich y Myszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54, 2000; Englebienne, Analyst. 123:1599, 1998). La instrumentación y procedimientos para la detección en tiempo real y la monitorización de las tasa de unión son conocidos y se encuentran disponibles comercialmente (BiaCore 2000,

Biacore AB, Upsala, Suecia, y Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335, 1999). Los valores de KD pueden definirse como la concentración de anticuerpo de OX40 requerida para saturar a la mitad (50%) los sitios de unión de OX40.

Entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen los anticuerpos que pueden unirse a OX40 presentes en una o más células *in vivo*, en aislados celulares primarios, células subcultivadas, células en cultivo y células inmortalizadas. Entre los tipos celulares no limitativos específicos que pueden expresar OX40 se incluyen las células T activadas y otras células T (por ejemplo células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas) y las células no T. Entre los ejemplos de células no T se incluyen las células asesinas naturales (NK), los granulocitos (neutrófilos), los monocitos y las células B. Las células que no expresan naturalmente OX40 puede hacerse que expresen OX40, por ejemplo mediante transfección o transformación de células con un ácido nucleico codificante de OX40. Los anticuerpos de OX40 capaces de unión a OX40 pueden unirse a una o más células transfectadas o transformadas que expresan o producen OX40.

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen anticuerpos que se unen a OX40 y modulan una función o actividad de OX40 *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo en un sujeto). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "modular" y variaciones gramaticales del mismo, utilizado en referencia a una actividad o función de OX40, se refiere a que la actividad o función de OX40 resulta detectablemente afectada, alterada o modificada. De esta manera, un anticuerpo de OX40 que modula una actividad o función de OX40 es un anticuerpo que afecta, altera o modifica detectablemente una o más actividades o funciones de OX40, entre las que pueden incluirse, por ejemplo, la unión de OX40 a un ligando de OX40, la señalización mediada por OX40 o una respuesta celular mediada por OX40 o modulable por OX40, u otra actividad o función de OX40 tal como se indica en la presente memoria o de otro modo conocida o conocible.

Entre las diversas actividades y funciones de OX40 no limitativas que pueden modularse se incluyen, por ejemplo, la señalización mediada por OX40 o una respuesta celular mediada por OX40 o modulable por OX40, la proliferación o expansión celular (por ejemplo linfocitos, tales como células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas), la supervivencia o apoptosis celular (por ejemplo linfocitos tales como células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas), citocinas (por ejemplo citocinas Th1, Th2 y no Th1/Th2) y la expresión o producción de interferón, la expresión o producción de proteínas antiapoptóticas o proapoptóticas, y el tratamiento, prevención o mejora de trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, patologías y síntomas de los mismos. Entre las citocinas específicas moduladas se incluyen, aunque sin limitación, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, FNT- $\alpha$ , interferón- $\gamma$  y GM-CSF (*in vivo* o *in vitro*). La expresión de proteínas antiapoptóticas o proapoptóticas específicas incluye, aunque sin limitación, Bcl-xL, Bcl-2, Bad y Bim. Entre otras actividades o funciones no limitativas de OX40 que pueden modularse se incluyen, por ejemplo, la activación de NF- $\kappa$ B, el mantenimiento de la actividad de PKB (Akt) y la regulación positiva de la survivina (Ambrosini et al., Nat. Med. 3:917, 1997, y Song et al., Immunity 22:621, 2005).

Por lo tanto, entre los anticuerpos ejemplificativos indicados en la presente memoria se incluyen anticuerpos que modulan una o más de entre la señalización mediada por OX40 o una respuesta celular mediada o inducida por OX40, la proliferación celular (por ejemplo de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas), la supervivencia o apoptosis celular (por ejemplo de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas), citocinas (por ejemplo las citocinas Th1, Th2 y otras no Th1/Th2, por ejemplo IL-17, IL-23 e IL-26) y la expresión o producción de interferón, tal como Th1, Th2, no Th1/Th2, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, FNT- $\alpha$ , interferón- $\gamma$  y GM-CSF (*in vivo* o *in vitro*), la expresión de proteínas antiapoptóticas o proapoptóticas (por ejemplo Bcl-xL, Bcl-2, Bad o Sim) y el tratamiento, prevención o mejora de trastornos, enfermedades, patologías y síntomas de los mismos. En aspectos particulares, los anticuerpos de la invención modulan la expansión o supervivencia de las células T, modulan el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, o reducen el número de células efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En aspectos particulares adicionales, los anticuerpos de la invención reducen o eliminan el número de células T autorreactivas específicas para un autoantígeno (por ejemplo la proteína básica de mielina (PBM), la glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (GOM), la proteína del proteolípido (PPL), el colágeno, los antígenos de tejido articular sinovial, la insulina, la ácido glutámico descarboxilasa, los antígenos intestinales, los antígenos tiroideos, las proteínas histonas, los antígenos musculares o los antígenos de la piel).

El término "antagonista" y variaciones gramaticales del mismo utilizadas en referencia a un anticuerpo de OX40 se refieren a un anticuerpo de OX40 que reduce, disminuye, inhibe, retrasa, impide o bloquea la unión d eOX40 a ligando de OX40, o reduce, disminuye, inhibe, retrasa, impide o bloquea una actividad o función de OX40. El término "agonista" y variaciones gramaticales del mismo utilizadas en referencia a un anticuerpo de OX40 se refieren a un anticuerpo de OX40 que estimula, incrementa, potencia, estimula o induce una actividad o función inducida por OX40. Por lo tanto, entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen los anticuerpos antagonistas y agonistas.

Los anticuerpos antagonistas de OX40 de la invención bloquean, reducen, disminuyen, inhiben o impiden una o más actividades o funciones de OX40 *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo. En unas formas de realización particulares se proporcionan anticuerpos de OX40 indicados en la presente memoria que pueden bloquear, reducir, disminuir, inhibir o impedir la unión de ligando de OX40 (OX40L) a OX40 (CD134) en la forma soluble u OX40 expresado

- sobre la superficie de las células T activadas. En unas formas de realización adicionales un anticuerpo de OX40 induce la lisis de células EL4 expresantes de OX40 humano o células T humanas activadas en presencia de células efectoras líticas (por ejemplo células asesinas naturales, macrófagos o neutrófilos). En aspectos particulares, el porcentaje (%) de lisis celular específica inducía a una concentración de 10 µg/ml de anticuerpo es de entre aproximadamente 15% y 75%, de entre 25% y 65%, o de entre 30% y 60%, y puede ser de hasta 100%, dependiendo de los niveles de fondo en los estudios. Además, la incubación de anticuerpos de OX40 ejemplificativos con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana cocultivados con CMSP de un donante alógénico reducen la proliferación celular mediante la inhibición de las células T CD4 y/o CD8 alorreactivas.
- Entre los anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen formas modificadas como se reivindican, tales como sustituciones (por ejemplo sustituciones de aminoácidos), adiciones y delecciones (por ejemplo subsecuencias o fragmentos), que pueden denominarse "variantes". Dichas formas de anticuerpo modificadas y variantes conservan por lo menos una función o actividad parcial de un anticuerpo de OX40 de referencia, por ejemplo un anticuerpo de OX40 denominado 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5, tal como la unión a OX40, o modulan una actividad o función de OX40 (por ejemplo la señalización de OX40). De esta manera, por ejemplo un anticuerpo de OX40 modificado puede conservar por lo menos una unión parcial a OX40 o la capacidad de modular una o más funciones o actividades de OX40 (por ejemplo la señalización, una respuesta celular, etc.).
- Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "modificar" y variaciones gramaticales del mismo, se refiere a que la composición se aparta de una composición de referencia. Las proteínas y ácidos nucleicos modificados y otras composiciones pueden presentar una actividad mayor o menor o una función diferente de las de una proteína o ácido nucleico no modificado u otra composición de referencia.
- En unos aspectos particulares, los anticuerpos modificados de la invención conservan una o más de entre una capacidad de modular la expansión o supervivencia de las células T, de modular el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, o de reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En unos aspectos particulares adicionales, los anticuerpos modificados de la invención conservan una o más de entre una capacidad de reducir o rebajar el número de células T alorreactivas específicas para un autoantígeno o de células B productoras de anticuerpos específicos para un autoantígeno (por ejemplo la proteína básica de mielina (PBM), la glucoproteína oligodendrocítica de la mielina (GOM), la proteína del proteolípido (PPL), el colágeno, los antígenos de tejido articular sinovial, la insulina, la ácido glutámico descarboxilasa, los antígenos intestinales, los antígenos tiroideos, las proteínas histonas, los antígenos musculares o los antígenos de la piel).
- En varias formas de realización de la divulgación, la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura del anticuerpo tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y en SEC ID nº 44 a nº 49 presenta una o más sustituciones de aminoácidos dentro o fuera de una región constante, una región determinante de complementariedad (RDC) o una región de marco (RM). En unos aspectos particulares, una sustitución de aminoácido es una sustitución conservadora dentro o fuera de una región constante, una región determinante de complementariedad (RDC) o una región de marco (RM). En varias formas de realización adicionales de la divulgación, los anticuerpos de la invención son idénticos por lo menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichos valores de porcentaje, respecto a una secuencia de cadena pesada o ligera de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55, o 112Z5, SEC ID nº 7 a nº 10 o SEC ID nº 44 a nº 49. Entre los números típicos de residuos sustituidos se incluyen 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10 residuos aminoácidos o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichos valores, o más residuos aminoácidos.
- Dichos anticuerpos que incluyen sustituciones de aminoácidos pueden estar codificados por un ácido nucleico. En consecuencia, también se proporcionan las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos que incluyen sustituciones de aminoácidos.
- Los términos "identidad" o "idéntico" se refieren a que dos o más entidades referenciadas son iguales. De esta manera, en el caso de que dos secuencias de proteínas (por ejemplo anticuerpos de OX40) sean idénticas, presentan la misma secuencia de aminoácidos, por lo menos dentro de la región o parte referenciada. Un "área de identidad" se refiere a una parte de dos o más entidades referenciadas que es igual en todas ellas. De esta manera, en el caso de que dos secuencias de proteínas sean idénticas en una o más regiones de secuencia, compartirán identidad dentro de dicha región. La expresión "identidad sustancial" se refiere a que una molécula se encuentra estructural o funcionalmente conservada, de manera que presenta, o se predice que presenta, por lo menos una función o actividad parcial de una o más de las funciones o actividades de la molécula de referencia, o región o parte relevante/correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte identidad. De esta manera, un polipéptido (por ejemplo el anticuerpo de OX40) con identidad sustancial presenta, o se predice que presenta, una actividad o función por lo menos parcial del polipéptido de referencia (por ejemplo el anticuerpo de OX40). Por ejemplo, en una forma de realización particular, un anticuerpo de OX40 que presenta una o más modificaciones (por ejemplo sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos) que conserva una actividad o función por lo menos parcial del anticuerpo de OX40 no modificado se considera que presenta una identidad sustancial respecto al anticuerpo de OX40 de referencia.

- Debido a la variación entre proteínas estructural y funcionalmente relacionadas, el nivel de identidad de secuencia requerido para conservar una función o actividad depende de la proteína, la región y la función o actividad de dicha región. Aunque la identidad de secuencia de aminoácidos puede ser de tan sólo 30% para proteínas que conservan una actividad o función dada, típicamente es superior, por ejemplo una identidad de 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% respecto a una secuencia de referencia. El grado de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando un programa informático y un algoritmo matemático conocido de la técnica. Dichos algoritmos que calculan el porcentaje de identidad de secuencia (homología) generalmente explican los huecos de secuencia y los apareamientos incorrectos a lo largo de las regiones de comparación. Por ejemplo, el algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo BLAST 2.0) (ver, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990, disponible públicamente a través del NCBI) presenta los parámetros de búsqueda ejemplificativos siguientes: apareamiento incorrecto -2; apertura de hueco 5; extensión de hueco 2. Para las comparaciones de secuencias de polipéptidos, típicamente se utiliza un algoritmo BLASTP en combinación con una matriz de puntuaciones, tal como PAM100, PAM250, BLOSUM62 o BLOSUM50. Los programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH también se utilizan para cuantificar el grado de identidad (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185, 2000, y Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195, 1981). También se han desarrollado programas para cuantificar la similitud estructural de las proteínas utilizando el mapeado topológico de Delaunay (Bostick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 304:320, 2003).
- Una "sustitución conservadora" es la sustitución de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. La expresión biológicamente similar se refiere a que la sustitución no destruye una actividad biológica, por ejemplo la actividad de unión de OX40. La expresión estructuralmente similar se refiere a que los aminoácidos presentan cadenas laterales de longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. La expresión similitud química se refiere a que los residuos presentan la misma carga o que ambos son hidrófilos o hidrófobos. Entre los ejemplos particulares se incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, glutamina por asparagina, o serina por treonina, y similares.
- Entre los anticuerpos modificados se incluyen además uno o más D-aminoácidos sustituidos por L-aminoácidos (y mezclas de los mismos), análogos estructurales y funcionales, por ejemplo peptidomiméticos que presentan aminoácidos sintéticos o no naturales o análogos y formas derivatizadas de aminoácidos. Entre las modificaciones se incluyen estructuras cíclicas, tales como un enlace amida extremo-a-extremo entre los extremos amino-terminal y carboxi-terminal de la molécula o un enlace disulfuro intra-molecular o inter-molecular.
- Entre los ejemplos no limitativos específicos adicionales de modificaciones de aminoácidos se incluyen subsecuencias y fragmentos de OX40. Las subsecuencias y fragmentos de OX40 ejemplificativos comprenden una parte de una secuencia de OX40 a la que se une un anticuerpo de OX40 ejemplificativo de la invención. Entre las subsecuencias y fragmentos de OX40 ejemplificativos se incluyen además una parte immunogénica, por ejemplo una parte de OX40 que incluye una secuencia a la que se une un anticuerpo de OX40 ejemplificativo de la invención.
- De acuerdo con la divulgación, se proporcionan un anticuerpo de OX40 y ácidos nucleicos codificantes de subsecuencias o fragmentos de anticuerpo de OX40 que conservan por lo menos en parte una función o actividad de un anticuerpo de OX40 no modificado o de referencia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "subsecuencia" o "fragmento" se refiere a una parte de la molécula de longitud completa. Una subsecuencia de un anticuerpo de OX40 codificador de un anticuerpo de OX40 presenta por lo menos un aminoácido menos que un OX40 de longitud completa (por ejemplo una o más delecciones de aminoácido internas o terminales del extremo amino-terminal o carboxi-terminal). Una subsecuencia de anticuerpo de OX40 presenta por lo menos un aminoácido menos que un anticuerpo de OX40 de longitud completa. Una subsecuencia de ácidos nucleicos presenta por lo menos un nucleótido menos que una secuencia de ácidos nucleicos de comparación de longitud completa. Por lo tanto, las subsecuencias pueden presentar cualquier longitud hasta la de OX40 nativo de longitud completa.
- Entre las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo de OX40 de la divulgación se incluyen una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. Entre las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo de OX40 de la invención se incluyen además Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos de dominio V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>.
- Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo de OX40 pueden presentar la afinidad de unión del anticuerpo de longitud completa, la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa, o una o más actividades o funciones del anticuerpo de longitud completa, por ejemplo una función o actividad del anticuerpo antagonista o agonista de OX40. Las expresiones "subsecuencia funcional" y "fragmento funcional" en referencia a un anticuerpo se refieren a una parte de anticuerpo que conserva por lo menos una parte de una o más funciones o actividades del anticuerpo de referencia de longitud completa, por ejemplo una función o actividad del anticuerpo de OX40.

Por ejemplo, una subsecuencia o fragmento de anticuerpo que se une a OX40 o a un fragmento de OX40 se considera una subsecuencia funcional.

Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo pueden combinarse. Por ejemplo, las subsecuencias de  $V_L$  o  $V_H$  pueden unirse mediante una secuencia conectora, formando de esta manera una quimera  $V_L-V_H$ . Una combinación de subsecuencias de Fv de cadena sencilla (scFv) pueden unirse mediante una secuencia conectora, formando de esta manera una quimera scFv-scFv. Entre las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo de OX40 se incluyen anticuerpos de cadena sencilla o una o más regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de otras subsecuencias de anticuerpo de OX40.

Pueden prepararse subsecuencias y fragmentos de anticuerpo mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos. Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpo producidos mediante corte enzimático con pepsina proporcionan un fragmento 5S denominado  $F(ab')_2$ . Este fragmento puede cortarse adicionalmente utilizando un agente reductor tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, un corte enzimático con pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y el fragmento Fc directamente (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.036.945 y nº 4.331.647, y Edelman et al., Methods Enzymol. 1:422, 1967). También pueden utilizarse otros procedimientos de corte de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, el corte adicional de fragmentos u otros procedimientos enzimáticos o químicos.

Pueden producirse proteínas y anticuerpos, así como subsecuencias y fragmentos de los mismos, mediante metodología genética. Entre las técnicas se incluyen la expresión de la totalidad o una parte del gen codificante de la proteína o anticuerpo en una célula hospedadora, tal como células Cos o de *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan la longitud completa o una subsecuencia, por ejemplo un scFv (ver, por ejemplo, Whitlow et al., en: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97, 1991; Bird et al., Science 242:423, 1988, y la patente US nº 4.946.778). Los Fv de cadena sencilla y los anticuerpos pueden producirse tal como se indica en las patentes US nº 4.946.778 y nº 5.258.498; Huston et al., Methods Enzymol. 203:46, 1991; Shu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995, 1993, y Skerra et al., Science 240:1038, 1988.

Entre las formas modificadas se incluyen secuencias derivatizadas, por ejemplo aminoácidos en los que los grupos amino libres forman hidrocloruros de amina, grupos de p-tolueno-sulfonilo, grupos carbobenzoxi; los grupos carboxi libres de sales, ésteres de metilo y de etilo; grupos hidroxilo libres que forman derivados O-acilo o O-alquilo, así como derivados de aminoácidos naturales, por ejemplo 4-hidroxiprolina, para la prolina, 5-hidroxilisina para lisina, homoserina para serina, ornitina para lisina, etc. Pueden producirse modificaciones utilizando procedimientos conocidos de la técnica (por ejemplo la mutagénesis por delección e inserción dirigida a sitio basada en PCR, la modificación y mutagénesis químicas, el entrecruzamiento, etc.).

Las formas modificadas de proteína (por ejemplo un anticuerpo), los ácidos nucleicos y otras composiciones incluyen adiciones e inserciones. Por ejemplo, una adición puede ser la unión covalente o no covalente de cualquier tipo de molécula a una proteína (por ejemplo un anticuerpo), ácido nucleico u otra composición. Típicamente las adiciones e inserciones confieren una función o actividad clara.

Entre las adiciones e inserciones se incluyen secuencias de polipéptido o de ácido nucleico de fusión (quiméricas), que son una secuencia que presenta una o más moléculas no presentes normalmente en una secuencia nativa (de tipo salvaje) de referencia unida covalentemente a la secuencia. Un ejemplo particular es una secuencia de aminoácidos de otra proteína (por ejemplo un anticuerpo) para producir una proteína multifuncional (por ejemplo un anticuerpo multiespecífico).

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen además quimeras o fusiones con uno o más dominios adicionales unidos covalentemente a los mismos que proporcionan una función o actividad diferente o complementaria. Entre los anticuerpos se incluyen quimeras o fusiones en las que se encuentran unidas dos o más secuencias de aminoácidos que no existen de manera natural en la naturaleza.

Según la divulgación se proporcionan anticuerpos de OX40 y ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos de OX40 que incluyen un dominio heterólogo. Los dominios heterólogos pueden ser una adición o inserción de aminoácido, aunque no se limitan a los residuos aminoácidos. De esta manera, un dominio heterólogo puede consistir de cualquier de entre una diversidad de tipos diferentes de fracciones funcionales pequeñas o grandes. Entre dichas fracciones se incluyen ácidos nucleicos, péptidos, carbohidratos, compuestos lipídicos u orgánicos pequeños, tales como un fármaco, metales (oro, plata), etc.

Entre los ejemplos no limitativos particulares de dominios heterólogos se incluyen, por ejemplo, etiquetas, marcas detectables y agentes citotóxicos. Entre los ejemplos específicos de etiquetas y marcas detectables se incluyen etiquetas de T7, de His, myc, HA y FLAG; enzimas (peroxidasa de rábano picante, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloranfenicol transferasa), sustratos enzimáticos, ligandos (por ejemplo biotina), receptores (avidina), radionucleidos (por ejemplo C<sup>14</sup>, S<sup>35</sup>, P<sup>32</sup>, P<sup>33</sup>, H<sup>3</sup>, I<sup>125</sup> e I<sup>131</sup>), reactivos electrodensos, moléculas de transferencia de energía, marcas paramagnéticos, fluoróforos (fluoresceína, rodamina y

ficoeritrina), cromóforos, agentes quimioluminiscentes (imidazol y luciferasa) y bioluminiscentes. Entre los ejemplos específicos de agentes citotóxicos se incluyen la toxina diftérica, la toxina del cólera y la ricina.

- 5 Pueden insertarse secuencias conectoras entre la proteína (por ejemplo el anticuerpo), el ácido nucleico u otra composición y la adición o inserción (por ejemplo el dominio heterólogo) de manera que las dos entidades mantengan, por lo menos en parte, una función o actividad diferente. Las secuencias conectoras pueden presentar una o más propiedades que incluyan una estructura flexible, una incapacidad para formar una estructura secundaria ordenada o un carácter hidrófobo o cargado, que podría estimular o interactuar con otro dominio. Entre los aminoácidos típicamente presentes en regiones de proteína flexibles se incluyen la glicina, la asparagina y la serina. También pueden utilizarse otros aminoácidos prácticamente neutros, tales como la treonina y la alanina, en la secuencia conectora. La longitud de la secuencia conectora puede variar (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.087.329). Entre los conectores se incluyen además agentes de entrecruzamiento y conjugación químicos, tales como los derivados sulfo-succinimidilo (sulfo-SMCC, sulfo-SMPB), el suberato de disuccinimidilo (DSS), el glutarato de disuccinimidilo (DSG) y el tartrato de disuccinimidilo (DST).
- 10 15 Entre los ejemplos adicionales de adiciones se incluyen la glucosilación, los ácidos grasos, los lípidos, la acetilación, la fosforilación, la amidación, la formilación, la ubiquitinación y la derivatización con grupos protectores o bloqueantes y cualquiera de entre numerosas modificaciones químicas. Otras permutaciones y posibilidades resultarán evidentes para el experto ordinario en la materia y se consideran comprendidas dentro del alcance de la invención.
- 20 25 Pueden prepararse dichas secuencias modificadas utilizando tecnología de ADN recombinante mediante la expresión celular o la traducción *in vitro*. También pueden producirse secuencias de polipéptido y de ácidos nucleicos mediante síntesis química utilizando procedimientos conocidos de la técnica, por ejemplo un aparato de síntesis peptídica automática (ver, por ejemplo Applied Biosystems, Foster City, CA).
- 30 35 Puede producirse proteína OX40 adecuada para generar anticuerpos mediante cualquiera de entre una diversidad de técnicas estándares de purificación de proteínas o de expresión recombinante. Por ejemplo, puede producirse una secuencia de OX40 mediante técnicas estándares de síntesis peptídica, tales como la síntesis en fase sólida. Una parte de la proteína puede contener una secuencia de aminoácidos, tales como una etiqueta de T7 o una secuencia polihistidina, para facilitar la purificación de la proteína expresada o sintetizada. La proteína puede expresarse en una célula y purificarse. La proteína puede expresarse como parte de una proteína de mayor tamaño (por ejemplo una fusión o quimera) mediante procedimientos recombinantes.
- 40 45 50 55 60 65 Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos de la técnica. Por ejemplo, OX40 o un fragmento inmunogénico del mismo, conjugado opcionalmente con un portador, tal como hemocianina de lapa americana (KLH) u ovoalbúmina (por ejemplo BSA) o mezclado con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, y utilizarse para inmunizar un animal. Utilizando la tecnología del hibridoma, pueden aislarse esplenocitos a partir de animales inmunitados que responden a OX40 y fusionarse con células de mieloma. Pueden cribarse los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas, para reactividad con OX40 o un fragmento inmunogénico del mismo.
- Entre los animales que pueden inmunizarse se incluyen primates, ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, vacas o cobayas. La inmunización inicial y cualquier inmunización posterior opcional puede realizarse por las vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Además, para incrementar la respuesta inmunitaria, el antígeno puede acoplarse a otra proteína, tal como la ovoalbúmina o la hemocianina de lapa americana (KLH), la tiroglobulina y el toxoide tetánico, o mezclarse con un adyuvante tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund. La inmunización inicial y cualquier inmunización posterior opcional puede realizarse por vía intraperitoneal, intramuscular, intraocular o subcutánea. Las inmunizaciones posteriores pueden llevarse a cabo a la misma concentración o a concentraciones diferentes de las preparaciones de OX40, y pueden realizarse a intervalos regulares o irregulares.
- Entre los animales se incluyen los modificados genéticamente para incluir loci génicos humanos, que pueden utilizarse para producir anticuerpos humanos. Los animales transgénicos con uno o más genes humanos de inmunoglobulina se describen en, por ejemplo, la patente US nº 5.939.598, y en los documentos nº WO 02/43478 y nº WO 02/092812. Utilizando la tecnología convencional del hibridoma, los esplenocitos de ratones inmunitados que son altamente sensibles al antígeno pueden aislarse y fusionarse con células de mieloma. Puede obtenerse un anticuerpo monoclonal que se une a OX40.
- Los procedimientos adicionales para producir anticuerpos policlonales humanos y anticuerpos monoclonales humanos han sido descritos (ver, por ejemplo, Kuroiwa et al., *Nat. Biotechnol.* 20:889, 2002; documentos nº WO 98/24893, nº WO 92/01047, nº WO 96/34096, nº WO 96/33735; patentes US nº 5.413.923, nº 5.625.126, nº 5.633.425, nº 5.569.825, nº 5.661.016, nº 5.545.806, nº 5.814.318, nº 5.885.793, nº 5.916.771 y nº 5.939.598).
- El término "humano" en caso de utilizarse en referencia a un anticuerpo, se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es totalmente humana, es decir, regiones constantes y variables de cadena pesada

humana y de cadena ligera humana. De esta manera, la totalidad de los aminoácidos son humanos o existen en un anticuerpo humano. Un anticuerpo que es no humano puede convertirse en totalmente humano mediante sustitución de los residuos aminoácidos no humanos por residuos aminoácidos que existen en un anticuerpo humano. Los residuos aminoácidos presentes en los anticuerpos humanos, mapas de región de RDC y residuos de consenso de anticuerpo humano son conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4a ed., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1987; Chothia y Lesk, 1987. Una secuencia de consenso de  $V_H$  humano subgrupo III, basada en un estudio de 22 secuencias humanas de  $V_H$  III, y una secuencia de consenso de  $V_L$  humana cadena kappa subgrupo I, basada en un estudio de 30 secuencias humanas de kappa I, se describe en Padlan, Mol. Immunol. 31:169, 1994, y Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991. Por lo tanto, entre los anticuerpos humanos se incluyen anticuerpos en los que se han sustituido uno o más residuos aminoácidos por uno o más aminoácidos presentes en cualquier otro anticuerpo humano.

Entre los anticuerpos de OX40 se incluyen anticuerpos humanizados que pueden producirse utilizando técnicas conocidas de la técnica, incluyendo, por ejemplo, la injertación de RDC (patente EP 0 239 400, documento nº WO91/09967; patentes US nº 5.225.539, nº 5.530.101 y nº 5.585.089), "veneering" o la resuperficialización (patentes EP 0 592 106 y EP 0 519 596; Padlan, Molecular Immunol. 28:489, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering 7:805, 1994; Roguska et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:969, 1994) y reorganización de cadenas (patente US nº 5.565.332). Las secuencias de consenso humanas (Padlan, Mol. Immunol. 31:169, 1994, y Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) han sido utilizadas anteriormente para producir anticuerpos humanizados (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992, y Presta et al., J. Immunol. 151:2623, 1993).

El término "humanizado" tal como se utiliza en referencia a un anticuerpo se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo presenta residuos aminoácidos no humanos (por ejemplo de ratón, de rata, de cabra, de conejo, etc.) de una o más regiones determinantes de complementariedad (RDC) que se unen específicamente al antígeno deseado en una molécula de inmunoglobulina humana aceptora, y uno o más residuos aminoácidos humanos en la región marco (RM) de Fv, que son residuos aminoácidos que flanquean las RDC. Los anticuerpos denominados "primatizados" se encuentran comprendidos dentro del significado de "humanizado", excepto en que la molécula de inmunoglobulina humana aceptora y los residuos aminoácidos de la región marco pueden ser cualquier residuo aminoácido de primate (por ejemplo de simio, de gibón, de gorila, de chimpancé, de orangután o de macaco), además de cualquier residuo humano. Los residuos de RM humanos de la inmunoglobulina pueden sustituirse por residuos no humanos correspondientes. Por lo tanto, los residuos en las regiones de RDC o de marco humanas pueden sustituirse por un residuo correspondiente del anticuerpo donante de RDC o de región marco no humano para alterar, generalmente para mejorar, la afinidad o especificidad para antígeno, por ejemplo. Un anticuerpo humanizado puede incluir residuos no presentes en el anticuerpo humano ni en las secuencias de RDC o de marco donantes. Por ejemplo, una sustitución de RM en una posición particular no presente en un anticuerpo humano o en el anticuerpo no humano donante puede predecirse que mejorará la afinidad o especificidad de unión del anticuerpo humano en esa posición. Las sustituciones de marco y de RDC de anticuerpo basadas en el modelaje molecular son bien conocidas de la técnica, por ejemplo mediante modelaje de las interacciones de los residuos de RDC y de marco para identificar los residuos de marco importantes para la unión de antígeno y la comparación entre secuencias para identificar residuos de marco no habituales en posiciones particulares (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.585.089 y Riechmann et al., Nature 332:323, 1988).

Entre los anticuerpos de OX40 se incluyen anticuerpos híbridos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "híbrido" y variaciones gramaticales del mismo, utilizado en referencia a un anticuerpo, se refiere a que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo contiene una o más partes que se derivan, se obtienen o se añlan o están basadas en dos o más especies diferentes. Por ejemplo, una parte del anticuerpo puede ser humana (por ejemplo una región constante) y otra parte del anticuerpo puede ser no humana (por ejemplo una región variable de cadena ligera pesada murina o ligera murina). De esta manera, un ejemplo de un anticuerpo híbrido es un anticuerpo en el que diferentes partes del anticuerpo son de orígenes específicos diferentes. Al contrario que un anticuerpo humanizado o primatizado, un anticuerpo híbrido puede presentar las diferentes secuencias específicas en cualquier región del anticuerpo.

Los procedimientos para producir anticuerpos híbridos son conocidos de la técnica (por ejemplo, Morrison, Science 229:1202, 1985; Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191, 1989, y patentes US nº 5.807.715, nº 4.816.567 y nº 4.816.397). Los anticuerpos híbridos en los que un dominio variable de un anticuerpo de una especie se sustituye por el dominio variable de otra especie se describen en, por ejemplo, Munro, Nature 312:597, 1984; Neuberger et al., Nature 312:604, 1984; Sharon et al., Nature 309:364, 1984; Morrison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851, 1984; Boulian et al., Nature 312:643, 1984; Capon et al., Nature 337:525, 1989, y Traunecker et al., Nature 339:68, 1989.

También pueden generarse anticuerpos de OX40 utilizando tecnologías de hibridoma, de recombinación y de expresión fágica, o una combinación de las mismas (ver las patentes US nº 4.902.614, nº 4.543.439 y nº 4.411.933; ver también Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol (editores), 1980, y Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed., 1988).

- Entre las técnicas adecuadas que pueden utilizarse adicionalmente en procedimientos de anticuerpos se incluyen la purificación de afinidad basada en OX40, la purificación en gel no desnaturalizante, la HPLC o la RP-HPLC, la exclusión por tamaño, la purificación en columna de proteína A, o cualquier combinación de dichas técnicas. El 5 isótipo del anticuerpo de OX40 puede determinarse utilizando un ensayo ELISA, por ejemplo puede identificarse una Ig humana utilizando anticuerpo anti-Ig humana adsorbida en Ig de ratón.
- La OX40 adecuada para generar anticuerpos puede producirse mediante cualquiera de entre una diversidad de 10 técnicas estándares de purificación de proteínas o de expresión recombinante conocidas de la técnica. Entre las formas de OX40 adecuadas para generar una respuesta inmunitaria se incluyen subsecuencias de OX40 tales como un fragmento inmunogénico. entre las formas adicionales de OX40 se incluyen células expresantes de OX40, preparaciones o extractos celulares o fracciones que contienen OX40, y OX40 parcialmente purificado.
- De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unas células aisladas o purificadas que expresan anticuerpos de 15 OX40, subsecuencias y fragmentos de los mismos, y ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos de OX40, y subsecuencias y fragmentos de la divulgación. En una forma de realización de la divulgación, una célula aislada expresa un anticuerpo que presenta las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo denominado 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En otra forma de realización de 20 la divulgación, una célula aislada expresa un anticuerpo que presenta la especificidad de unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En una forma de realización adicional de la divulgación, una célula aislada expresa un anticuerpo que compite con el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominado 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 para la unión de OX40. En una forma de realización adicional de la divulgación, una célula aislada expresa un 25 anticuerpo que presenta una afinidad de unión mayor o menos para OX40 que el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En unos aspectos particulares de la divulgación, la afinidad de unión para OX40 es de entre aproximadamente 1 y 5.000 veces la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominado 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En unos aspectos particulares adicionales de la divulgación, la afinidad de unión para OX40 es de entre 30 aproximadamente KD  $10^{-6}$  M y aproximadamente KD  $10^{-13}$  M la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. Entre los ejemplos no limitativos específicos de células aisladas o purificadas que expresan anticuerpos de OX40, subsecuencias y fragmentos de los mismos, y ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos de OX40, subsecuencias ya fragmentos de la divulgación, se incluyen células de bazo, células de hibridoma y células CHO. Las células aisladas o purificadas pueden ser una pluralidad o población de células de un aislado celular primario (por ejemplo esplenocitos), un aislado celular 35 secundario o subcultivado, o un cultivo celular establecido o inmortalizado (hibridoma o células CHO).
- De acuerdo con la divulgación se proporcionan además procedimientos para producir anticuerpos que se unen específicamente a OX40. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento para producir un anticuerpo de OX40 incluye la administración de OX40 humano, subsecuencia o fragmento (por ejemplo un dominio extracelular de OX40), opcionalmente conjugado con proteína recombinante Fc humana, en un animal 40 capaz de expresar inmunoglobulina humana (por ejemplo un ratón transgénico o una vaca transgénica), cribar el animal para la expresión de anticuerpo de OX40 humano y seleccionar un animal que produzca un anticuerpo de OX40 humano y aislar el anticuerpo a partir del animal seleccionado. En un aspecto de la divulgación, el procedimiento determina si el anticuerpo de OX40 humano presenta actividad antagonista o agonista de OX40.
- De acuerdo con la divulgación, se proporcionan adicionalmente unos procedimientos para producir anticuerpos de 45 OX40 humanos que inhiben o impiden la unión de OX40 a ligando de OX40 (OX40L). En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento para producir un anticuerpo de OX40 humano incluye administrar OX40, subsecuencia o fragmento (por ejemplo un dominio extracelular de OX40), opcionalmente conjugado con proteína recombinante Fc humana en un animal capaz de expresar inmunoglobulina humana (por ejemplo un ratón transgénico o una vaca transgénica), cribar el animal para la expresión de anticuerpo de OX40 humano, seleccionar 50 un animal que produce un anticuerpo de OX40 humano y aislar un anticuerpo a partir del animal seleccionado que produce anticuerpo de OX40 humano. En un aspecto, el procedimiento determina si el anticuerpo de OX40 humano inhibe o impide la unión de OX40 a ligando de OX40 (OX40L).
- De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos animales transgénicos no humanos que expresan un anticuerpo de OX40 que presenta una o más de las características siguientes: a) es idéntica a un anticuerpo 55 producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, b) se une a un epítopo en una secuencia de aminoácido del dominio extracelular de OX40 al que se un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, c) presenta una afinidad de unión de OX40 de entre aproximadamente 1 y 5.000 veces la de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominado 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, d) presenta una afinidad de 60 unión a OX40 de entre aproximadamente KD  $10^{-6}$  M y aproximadamente KD  $10^{-12}$  de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, e) presenta la especificidad de unión de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32,

112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, o f) compite con un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5 para la unión a OX40.

5 De acuerdo con la divulgación, se proporcionan además ácidos nucleicos aislados o purificados codificantes de anticuerpos de OX40, o subsecuencias y fragmentos de los mismos. En varias formas de realización de la divulgación, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura tal como se muestra en SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49, o una subsecuencia de la misma. En unas formas de realización adicionales de la divulgación, una secuencia de ácidos nucleicos comprende cualquiera de entre SEC ID nº 3 a nº 6 y SEC ID nº 38 a nº 43, y subsecuencias de las mismas. En una forma de 10 realización adicional de la divulgación una secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia degenerada con respecto a cualquiera de entre SEC ID nº 3 a nº 6 y SEC ID nº 38 a nº 43, y subsecuencias de las mismas.

15 Los ácidos nucleicos pueden ser de diversas longitudes. Las longitudes de los ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos de OX40 de la invención o subsecuencias de los mismos típicamente presentan entre aproximadamente 100 y 600 nucleótidos, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichas longitudes, 150 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 350, 350 a 400, 400 a 450, 450 a 500, 500 a 550 o aproximadamente 550 a 600 nucleótidos de longitud, o cualquier valor o intervalo numérico o valor comprendido dentro o que incluye dichas longitudes. Las longitudes de los ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con los ácidos nucleicos codificantes de los anticuerpos de OX40 de la invención o subsecuencias 20 de los mismos típicamente se encuentran comprendidas entre aproximadamente 10 y 20, 20 y 30, 30 y 50, 50 y 100, 100 y 150, 150 y 200, 200 y 250, 250 y 300, 300 y 400, 400 y 500 o 500 y 600 nucleótidos, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichas longitudes.

25 Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a por lo menos dos o más pares de bases (nucleótidos) de ácido ribo o desoxi-ribonucleico que se unen mediante un enlace fosfoéster o equivalente. Entre los ácidos nucleicos se incluyen polinucleótidos y polinucleósidos. Entre los ácidos nucleicos se incluyen moléculas individuales, dobles o tríplex, circulares o lineales. Entre los ácidos nucleicos ejemplificativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ARN, ADN, ADNc, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos naturales y no naturales, por ejemplo ácidos nucleicos sintéticos. Los ácidos nucleicos cortos y polinucleótidos (por ejemplo de 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50 o 50 a 100 nucleótidos) se denominan comúnmente "oligonucleótidos" o "sondas" del ADN de cadena sencilla o de doble cadena.

35 Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos que presenta una o más sustituciones, adiciones o delecciones de residuos aminoácidos de la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera tal como se muestra en cualquiera de entre SEC ID nº 7 a nº 10 y SEC ID nº 44 a nº 49. En una forma de realización, la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera sustituida, añadida o delecionada presenta una afinidad de unión para un epítopo del dominio extracelular de OX40. En otra forma de realización, la secuencia de región variable de cadena pesada o ligera sustituida, añadida o delecionada presenta una actividad de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 40 112Z5, por ejemplo la modulación de una función o actividad de OX40.

45 La divulgación proporciona unos ácidos nucleicos que se hibridan con un ácido nucleico que codifica la totalidad o una subsecuencia de un anticuerpo de OX40 producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, que presenta una complementariedad de por lo menos 80% a 90% o es homóloga respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la totalidad o una subsecuencia o fragmento del anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5. En una forma de realización de la divulgación, la secuencia de ácidos nucleicos presenta una longitud de entre aproximadamente 10 y 20, 20 y 30, 30 y 50, 50 y 100, 100 y 150, 150 y 200, 200 y 250, 250 y 300, 300 y 400, 400 y 500, 500 y 600 nucleótidos, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichas longitudes. En unos aspectos particulares de la divulgación, la secuencia de ácidos nucleicos hibrida con una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera, o una parte de la misma (por ejemplo una RDC, una RM, etc.) de un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5.

55 El término "hibridar" y variaciones gramaticales del mismo se refiere a la unión entre secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias hibridantes generalmente presenta una homología superior a aproximadamente el 50% respecto a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una secuencia de referencia (por ejemplo el anticuerpo de OX40). La región de hibridación entre las secuencias hibridantes típicamente presenta por lo menos aproximadamente 12 a 15 nucleótidos, 15 a 20 nucleótidos, 20 a 30 nucleótidos, 30 a 50 nucleótidos, 60 50 a 100 nucleótidos, 100 a 200 nucleótidos, 300 a 400 nucleótidos o más, o cualquier valor o intervalo numérico comprendido dentro o que incluye dichas longitudes.

65 Entre las secuencias de ácidos nucleicos se incluyen además sustituciones, adiciones y delecciones de nucleótidos y nucleósidos, así como formas derivatizadas y secuencias de fusión/químicas (por ejemplo codificantes de anticuerpo de OX40 fusionado con un dominio heterólogo). Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, entre los ácidos nucleicos se incluyen secuencias y subsecuencias degeneradas con respecto a los

ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 y 112Z5. Otros ejemplos son ácidos nucleicos complementarios a una secuencia que codifica un anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 o 112Z5, subsecuencias y fragmentos de la misma.

- 5 Pueden producirse ácidos nucleicos utilizando diversas técnicas estándares de clonación y síntesis química. Entre las técnicas se incluyen, aunque sin limitación, la amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con dianas de ADN genómico o ADNc utilizando cebadores (por ejemplo una mezcla de cebadores degenerados) capaces de hibridarse con una secuencia codificante del anticuerpo. También 10 pueden producirse ácidos nucleicos mediante síntesis química (por ejemplo síntesis de fosforamidita en fase sólida) o la transcripción a partir de un gen. A continuación, las secuencias producidas pueden traducirse *in vitro* o clonarse en un plásmido y propagarse y después expresarse en una célula (por ejemplo una célula hospedadora tal como una levadura o bacteria, un eucariota tal como una célula animal o de mamífero, o en una planta).
- 15 Según la divulgación, se proporcionan además secuencias de ácidos nucleicos de la invención que incluyen vectores. En una forma de realización de la divulgación, un vector incluye una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento del mismo. En formas de realización particulares de la divulgación, un vector incluye una secuencia de ácidos nucleicos codificante de cualquier anticuerpo producido por una estirpe celular de hibridoma denominada 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y5 y 112Z5, 20 subsecuencia o fragmento de la misma.

Los vectores son vehículos que pueden manipularse mediante inserción o incorporación de un ácido nucleico. Entre los vectores se incluyen vectores plasmídicos, víricos, procarióticos (bacterianos) y eucarióticos (vegetales, 25 fúngicos y de mamífero). Los vectores pueden utilizarse para la expresión de ácidos nucleicos *in vitro* o *in vivo*. Dichos vectores, denominados "vectores de expresión" resultan útiles para introducir ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de OX40, subsecuencias y fragmentos de los mismos, y expresar la proteína codificada *in vitro* (por ejemplo en solución o en fase sólida), en células o en un sujeto *in vivo*.

30 Los vectores también pueden utilizarse para la manipulación de los ácidos nucleicos. Para la manipulación genética, pueden utilizarse "vectores de clonación", y para transcribir o traducir el ácido nucleico insertado, *in vitro* (por ejemplo en solución o en fase sólida), en células o en un sujeto *in vivo*.

35 Un vector generalmente contiene un origen de replicación para la propagación en una célula *in vitro* o *in vivo*. Pueden incluirse elementos de control, incluyendo elementos de control de la expresión, presentes dentro de un vector, para facilitar la transcripción y traducción, según resulte apropiado.

40 Los vectores pueden incluir un marcador de selección. Un "marcador de selección" es un gen que permite la selección de las células que contienen el gen. La expresión "selección positiva" se refiere a un procedimiento de selección de las células que contienen el marcador de selección con la exposición a la selección positiva. La resistencia a fármaco es un ejemplo de una selección positiva; las células-marcador, que contiene el marcador, sobreviven en un medio de cultivo que contiene el fármaco y las células que no presentan el marcador, morirán. Entre los marcadores de selección se incluyen genes de resistencia a fármaco tales como *neo*, que confiere resistencia a G418; *hygr*, que confiere resistencia a la higromicina, y *puro*, que confiere resistencia a la puromicina. Entre otros genes de marcador de selección positiva se incluyen genes que permiten la identificación o cribado de 45 células que contienen el marcador. Entre estos genes se incluyen genes para proteínas fluorescentes (GFP y cromóforos similares a CGP, luciferasa), el gen *lacZ*, el gen de la fosfatasa alcalina y marcadores de superficie tales como CD8, entre otros. La expresión "selección negativa" se refiere a un procedimiento en el que las células que contienen un marcador de selección negativa resultan eliminadas con la exposición a un agente de selección negativa apropiado. Por ejemplo, las células que contienen el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simplex 50 (HSV-tk) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977) son sensibles al fármaco ganciclovir (GANC). De manera similar, el gen *gpt* provoca que las células sean sensibles a la 6-tioxantina.

55 Entre los vectores víricos se incluyen los basados en virus retrovirus (lentivirus para la infección de células en división, así como las células no en división), los virus espumosos (patentes US nº 5.624.820, nº 5.693.508, nº 5.665.577, nº 6.013.516 y nº 5.674.703; documentos nº WO92/05266 y nº WO92/14829), adenovirus (patentes US nº 5.700.470, nº 5.731.172 y nº 5.928.944), virus adenoasociados (VAA) (patente US nº 5.604.090), vectores de virus herpes simplex (patente US nº 5.501.979), vectores basados en el citomegalovirus (CMV) (patente US nº 5.561.063), reovirus, genomas de rotavirus, virus 40 del simio (SV40) o virus del papiloma (Cone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349, 1984; Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982;

60 Sarver et al., Mol. Cell. Biol. 1:486, 1981; patente US nº 5.719.054). Los adenovirus infectan eficientemente células de replicación lenta y/o terminalmente diferenciadas y puede utilizarse para reconocer células de replicación lenta y/o terminalmente diferenciadas. Entre los vectores víricos adicionales útiles para la expresión se incluyen parvovirus, virus Norwalk, coronavirus, paramixovirus y rabdovirus, togavirus (por ejemplo virus sindbis y virus del bosque de Semliki) y el virus de la estomatitis vesicular (VEV).

Los vectores que incluyen un ácido nucleico pueden expresarse al ligar operablemente el ácido nucleico a un elemento de control de la expresión. La expresión "operablemente ligado" se refiere a una relación física o funcional entre los elementos referenciados que les permite funcionar de la manera pretendida. De esta manera, un ácido "operablemente ligado" a un elemento de control de la expresión se refiere a que el elemento de control modula la transcripción del ácido nucleico y, según resulte apropiado, la traducción del transcripto.

Un "elemento de control de la expresión" o "secuencia de control de la expresión" es un polinucleótido que influye sobre la expresión de un ácido nucleico operablemente ligado. Los promotores e intensificadores son ejemplos no limitativos particulares de elementos y secuencias de control de la expresión. Un "promotor" es una región reguladora del ADN de acción en cis capaz de iniciar la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos posterior (en dirección 3'). La secuencia promotora incluye nucleótidos que facilitan el inicio de la transcripción. Los intensificadores también regulan la expresión de los ácidos nucleicos pero pueden funcionar a distancia del sitio de inicio de la transcripción del ácido nucleico al que se encuentran operablemente ligados. Los intensificadores funcionan en el caso de que se encuentren situados en el extremo 5' o 3' del ácido nucleico, así como dentro del ácido nucleico (por ejemplo intrones o secuencias codificantes). Entre los elementos de control de la expresión adicionales se incluyen secuencias líder y secuencias de pareja de fusión, elementos de sitio de unión ribosómica interna (IRES) para la creación de mensajes multigénicos, o policistrónicos, señal de procesamiento para intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción dentro del marco del ARNm, señal de poliadenilación para proporcionar la poliadenilación correcta del transcripto de interés, y codones de parada.

Entre los elementos de control de la expresión se incluyen elementos "constitutivos" en los que se produce la transcripción de un ácido nucleico operablemente ligado sin la presencia de una señal o estímulos. Los elementos de control de la expresión que confieren expresión en respuesta a una señal o estímulos, que incrementan o reducen la expresión del ácido nucleico operablemente ligado, son "regulables". Un elemento regulable que incrementa la expresión de un ácido nucleico operablemente ligado en respuesta a una señal o estímulos se denomina "elemento inducible". Un elemento regulable que reduce la expresión del ácido nucleico operablemente ligado en respuesta a una señal o estímulos denominado "elemento reprimible" (es decir, la señal reduce la expresión; en el caso de que se elimine la señal o se encuentre ausente, se incrementa la expresión).

Para la expresión bacteriana, entre los promotores constitutivos se incluyen T7, así como promotores inducibles tales como pL del bacteriófago λ, plac, ptrp, ptac (promotor de híbrido ptrp-lac). En sistemas de células de insecto, pueden utilizarse promotores constitutivos o inducibles (por ejemplo ecdisona). En la levadura, entre los promotores constitutivos se incluyen, por ejemplo, ADH o LEU2 y promotores inducibles tales como GAL (ver, por ejemplo, Ausubel et al., en: Current Protocols in Molecular Biology, vol. 2, cap. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1988; Grant et al., en: Methods in Enzymology 153:516-544, 1987, editores Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y.; Glover, DNA Cloning, vol. II, cap. 3, IRL Press, Wash., D.C., 1986; Bitter, en: Methods in Enzymology 152:673-684, 1987, editores Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., y Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, editores, Cold Spring Harbor Press, vols. I y II, 1982).

Para la expresión en mamíferos, pueden utilizarse promotores constitutivos de origen vírico o de otros orígenes. Por ejemplo, el CMV, el SV40 o las repeticiones terminales largas (RTL) víricas y similares, o los promotores inducibles derivados del genoma de las células de mamífero (por ejemplo el promotor IIA de la metalotioneína, el promotor de choque térmico, los elementos de respuesta de esteroide/hormona tiroidea/ácido retinoico) o de virus de mamífero (por ejemplo el promotor tardío adenovírico, las RTL de virus tumoral mamario de ratón).

Entre los elementos de control de la expresión se incluyen elementos activos en un tipo particular de tejido o célula, denominados "elementos de control de la expresión específicos de tejido". Los elementos de control de la expresión específicos de tejido típicamente son más activos en tipos celulares o de tejido específicos debido a que son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores de la transcripción activos en el tipo específico de célula o tejido, en comparación con otros tipos de célula o tejido. Son ejemplos no limitativos particulares de dichos elementos de control de la expresión, promotores tales como la hexocinasa II, COX-2, la alfa-proteína, el antígeno carcinoembrionario, DE3/MUC1, el antígeno prostático específico, C-erB2/neu, el polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (PIG), la telomerasa transcriptasa inversa y el promotor sensible a la hipoxia.

Según la divulgación, se proporcionan células hospedadoras transformadas o transfectadas con ácido nucleico o vector de OX40 de la invención. Entre las células hospedadoras se incluyen, aunque sin limitación, células procarióticas y eucarióticas tales como bacterias, hongos (levaduras), vegetales, de insecto y animales (por ejemplo de mamífero, incluyendo de primate y humanas). Entre los ejemplos no limitativos de células transformadas se incluyen bacterias transformadas con ácidos nucleicos de bacteriófago recombinantes, ácidos nucleicos plasmídicos o vectores de expresión cósmodios de ácidos nucleicos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes; células vegetales infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo virus del mosaico de la coliflor, VMCA; virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo el plásmido Ti); células de insecto infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo baculovirus) y células animales

- 5 infectadas por vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo retrovirus, adenovirus o virus Vaccinia), o células animales transformadas manipuladas para la expresión estable. Un ejemplo no limitativo de una célula hospedadora de mamífero que expresa anticuerpos de OX40, subsecuencias y fragmentos de la misma incluye una célula CHO. Las células hospedadoras pueden ser una pluralidad o población de células de un aislado celular primario, una célula secundaria o subcultivada aislada, o un cultivo celular establecido o inmortalizado.
- 10 El término "transformada" o "transflectada" utilizado en referencia a una célula (por ejemplo una célula hospedadora) u organismo se refiere a un cambio genético en una célula tras la incorporación de una molécula exógena, por ejemplo una proteína o ácido nucleico (por ejemplo un transgén) en la célula. De esta manera, una célula "transflectada" o "transformada" es una célula, o progenie de la misma, en la que se ha introducido una molécula exógena de manera artificial, por ejemplo mediante técnicas de ADN recombinante.
- 15 El ácido nucleico o proteína puede transflectarse o transformarse (expresarse) estable o transitoriamente en la célula o progenie de la misma. La célula o células pueden propagarse y la proteína introducida expresarse, o transcribirse el ácido nucleico. La progenie de una célula transflectada o transformada puede no ser idéntica a la célula parental, ya que pueden producirse mutaciones durante la replicación.
- 20 Típicamente, la transfección o transformación celular utiliza un vector. Un vector puede encontrarse comprendido dentro de una partícula vírica o vesícula y opcionalmente dirigirse a tipos celulares particulares mediante inclusión de una proteína sobre la superficie de la partícula o vesícula que se une a un ligando o receptor de la célula diana. De esta manera, la partícula vírica o vesícula misma, o una proteína sobre la superficie vírica, puede hacerse que reconozca células para la transfección o transformación *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. De acuerdo con lo anterior, se encuentran incluidos los medios de vector vírico y no vírico de administración en células, tejidos u órganos, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.
- 25 25 La introducción de ácidos nucleicos en las células diana (por ejemplo células hospedadoras) también puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos de la técnica, tales como el choque osmótico (por ejemplo el fosfato de calcio), la electroporación, la microinyección, la fusión celular, etc. La introducción del ácido nucleico y el polipéptido *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* también puede llevarse a cabo utilizando otras técnicas. Por ejemplo, una sustancia polimérica, tal como poliésteres, ácidos poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de láctido/glicólido, copolímeros de poliláctico/glicólido o copolímeros de etileno-acetato de vinilo. Un ácido nucleico puede atraparse en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo mediante la utilización de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, o microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en un sistema coloidal. Entre los sistemas de dispersión coloidal se incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.
- 30 35 40 Los liposomas para introducir diversas composiciones en las células son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilsérina, lipofectina y DOTAP (por ejemplo las patentes US nº 4.844.904, nº 5.000.959, nº 4.863.740 y nº 4.975.282, y GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md). Los lípidos catiónicos anfifílicos basados en piperazinas útiles para la terapia génica también son conocidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.861.397). Los sistemas de lípidos catiónicos también son conocidos (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.459.127). Las sustancias poliméricas, microcápsulas y sistemas de dispersión coloidal, tales como liposomas, se denominan colectivamente en la presente memoria "vesículas".
- 45 50 Los anticuerpos de OX40 de la invención resultan útiles en aplicaciones de tratamiento, terapéuticas y diagnósticas, incluyendo en procedimientos clínicos y diagnósticos. Por ejemplo, en un modelo de ratón de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda y crónica en el que se transfieren CMSP humanas a ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID) irradiados, los anticuerpos antagonistas humanos anti-OX40 humano redujeron el número de células T humanas y la patología de la enfermedad al administrarse antes o después de la aparición de la enfermedad. De esta manera, los anticuerpos de OX40 de la invención son capaces de reducir, disminuir o bloquear un síntoma de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) en un modelo de enfermedad del injerto contra el huésped aguda o crónica y causar la remisión o la regresión de la enfermedad del injerto contra el huésped en un modelo de enfermedad del injerto contra el huésped aguda o crónica (por ejemplo un ratón inmunodeficiente (SCID)). Los anticuerpos de la invención también fueron capaces de inducir la lisis de las células expresantes de OX40 por las células asesinas naturales. Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, la lisis de las células expresantes de OX40 podría deberse a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 55 60 65 Por lo tanto, los anticuerpos de OX40 de la invención resultan útiles en el tratamiento o la terapia de trastornos y enfermedades que son susceptibles de modulación o pueden responder favorablemente a la modulación de una actividad o función de OX40. De esta manera, puede utilizarse un anticuerpo antagonista de OX40 para tratar trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, patologías y síntomas de los mismos que son susceptibles o es probable que respondan favorablemente a la reducción, disminución, inhibición, prevención o bloqueo de la actividad o función de OX40, mientras que puede utilizarse un anticuerpo agonista de OX40 para tratar trastornos,

enfermedades, condiciones fisiológicas, patologías y síntomas de los mismos que son susceptibles es probable que respondan favorablemente a la estimulación, incremento, potenciación, estimulación o inducción de la actividad o función de OX40.

- 5 De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos de tratamiento de trastornos, enfermedades, condiciones, patologías y síntomas adversos o anormalidades asociados a respuestas inmunitarias no deseables o aberrantes. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "respuesta inmunitaria no deseable" o "respuesta inmunitaria aberrante" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria, actividad o función que sea superior o inferior de lo deseado o de lo fisiológicamente normal. Una respuesta inmunitaria, función o actividad no deseable puede ser una respuesta, función o actividad normal. De esta manera, las respuestas inmunitarias normales, la condición de que resulten no deseables, aunque no se consideren aberrantes, se encuentran incluidas dentro del significado de dichas expresiones. Una respuesta inmunitaria, función o actividad no deseable también puede ser una respuesta, función o actividad anormal. Una respuesta inmunitaria, función o actividad anormal (aberrante) se desvía de la normalidad. Las respuestas inmunitarias no deseables y aberrantes pueden ser humorales, celulares o una combinación de las mismas, siendo crónicas o agudas.

Un ejemplo de una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante es una respuesta inmunitaria que es excesiva, tal como en el caso de un trastorno o enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo la autoinmunidad). Otro ejemplo de una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante es una en la que la respuesta inmunitaria conduce a la inflamación aguda o crónica en cualquier tejido u órgano. Todavía otro ejemplo de una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante es una en la que la respuesta inmunitaria conduce a la destrucción de células, tejidos u órganos, tal como un rechazo de trasplante, la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), un trastorno o enfermedad autoinmunitario, o la inflamación. Todavía otro ejemplo de una respuesta inmunitaria no deseable o aberrante es una en la que la respuesta inmunitaria es deficiente, tal como en donde la respuesta a un antígeno es inferior a la deseada, por ejemplo se ha producido tolerancia.

Por lo tanto, entre las respuestas inmunitarias no deseables y aberrantes se incluyen los trastornos y enfermedades inmunitarios crónicos y agudos, caracterizados por condiciones y patologías fisiológicos, y síntomas adversos de anormalidades, dependiendo del trastorno o enfermedad. Entre los ejemplos no limitativos particulares de trastornos y enfermedades inmunitarios a los que se aplica la invención se incluyen la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), el rechazo del trasplante, los trastornos autoinmunitarios y la inflamación.

De acuerdo con la divulgación, se proporcionan el tratamiento *in vivo* y procedimientos terapéuticos basados, por lo menos en parte, en la capacidad de los anticuerpos de OX40 de modular una actividad o función de OX40. En los procedimientos particulares de formas de realización de tratamiento de la divulgación, los trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, patologías y síntomas susceptibles de responder o que podrían responder al tratamiento o terapia con anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen, por ejemplo, una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo. En procedimientos adicionales de formas de realización de tratamiento de la divulgación, entre los trastornos, enfermedades, condiciones fisiológicas, patologías y síntomas susceptibles de tratamiento o terapia con anticuerpos de OX40 de la invención se incluyen, por ejemplo, inflamación, rechazo del trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), un trastorno o enfermedad autoinmunitario, tal como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes (por ejemplo diabetes mellitus insulino-dependiente, DMID, diabetes de tipo I), enfermedad de Crohn (EC), enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis ulcerosa (CU), enfermedad celíaca, soriasis, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis del lupus proliferativo, miopatía granulomatosa, polimiositis y una respuesta celular mediada por OX40 que resulta no deseable o aberrante, por ejemplo.

La divulgación proporciona por lo tanto unos procedimientos en los que se utilizan anticuerpos de OX40, o subsecuencias o fragmentos de los mismos, para reducir, disminuir, inhibir, impedir o bloquear una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, rechazo del trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), o trastorno autoinmunitario, tal como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la diabetes (por ejemplo la diabetes mellitus insulino-dependiente, DMID, diabetes de tipo I), la enfermedad de Crohn (EC), la enfermedad intestinal inflamatoria (EII), la colitis ulcerosa (CU), la enfermedad celíaca, la soriasis, el lupus eritematoso sistémico (LES), la nefritis del lupus proliferativa, la miopatía granulomatosa, la polimiositis o una respuesta celular mediada por OX40 que resulta no deseable o aberrante, tratamiento y reduciendo, disminuyendo, inhibiendo, impidiendo y bloqueando la inflamación pulmonar en la hiperreactividad/hipersensibilidad de las vías respiratorias (por ejemplo el asma o el asma alérgica) y en otros tejidos y órganos. Son ejemplos no limitativos específicos de un síntoma de la enfermedad del injerto contra el huésped tratable según la invención, la pérdida de peso, la pérdida de pelo, las erupciones cutáneas, la hematuria, el hidroperitoneo y los infiltrados celulares inflamatorios en el hígado, el tracto intestinal, el pulmón, la piel y la muerte.

Los anticuerpos de OX40 también resultan útiles para reducir, disminuir, inhibir, impedir y bloquear la inflamación presente en pulmón, articulaciones, músculos, piel, sistema nervioso central o periférico o intestino. Los anticuerpos de OX40 resultan adicionalmente útiles para reducir, disminuir, inhibir, impedir y bloquear la inflamación que resulta de la respuesta de un sujeto a agentes infecciosos (por ejemplo agentes infecciosos bacterianos, víricos o parasitarios).

Entre las afecciones adicionales susceptibles de tratamiento o terapia con anticuerpos de OX40 se incluyen, por ejemplo, osteoartritis, artritis soriática, encefalomielitis, miastenia grave, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis atópica, dermatitis eccematosas, soriasis, síndrome de Sjögren, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, eritema nodoso leproso, uveitis autoinmunitaria, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición sensorineurial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática (TPI), policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, líquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveitis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, tiroiditis de Hashimoto, síndrome poliglandular autoinmunitario, infertilidad mediada inmunitariamente, enfermedad de Addison autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, dermatitis herpetiforme, alopecia autoinmunitaria, vitílico, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia perniciosa, síndrome de Guillain-Barre, síndrome del hombre rígido, fiebre reumática aguda, fiebre, oftalmia simpática, síndrome de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, síndrome antifosfolípido, asma (por ejemplo asma alérgico) y alergias.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "trasplante" y variaciones gramaticales del mismo se refieren a la injertación, implantación o trasplante de una célula, tejido u órgano de una parte del cuerpo en otra parte, o de un individuo o animal en otro individuo o animal. Por lo tanto, la célula, tejido u órgano transplantado puede ser un aloinjerto o xenoinjerto. Entre las células transplantadas ejemplificativas se incluyen células de médula ósea, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica o células madre de sangre umbilical, células alogénicas o no alogénicas y células neurales. Entre los tejidos para trasplante ejemplificativos se incluyen la piel, vasos sanguíneos, ojos y médula ósea. Entre los órganos de trasplante ejemplificativos se incluyen riñón, corazón, pulmón, páncreas e hígado. El término incluye además células, tejidos y órganos modificados genéticamente, por ejemplo mediante terapia génica ex vivo en la que las células, tejidos u órganos transformados se obtienen o se derivan de un sujeto (por ejemplo un ser humano o animal) que seguidamente recibe el trasplante de un sujeto diferente (por ejemplo ser humano o animal).

La inflamación tratable según la invención incluye respuestas inflamatorias mediadas por OX40 o susceptibles de tratamiento con anticuerpo de OX40 debido a la modulación de OX40, que a su vez pueden modular uno o más de entre proliferación, supervivencia o muerte celular, o la actividad de los linfocitos (por ejemplo células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas), etc. Los procedimientos (por ejemplo el tratamiento) pueden resultar en una reducción de la incidencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la inflamación. Entre los síntomas ejemplificativos de inflamación se incluyen uno o más de entre hinchazón, dolor, erupción cutánea, cefalea, fiebre, náusea, rigidez de las articulaciones esqueléticas, o daños en los tejidos o células.

La inflamación puede provocar, directa o indirectamente, daños en las células, tejidos u órganos, en múltiples células, tejidos u órganos, o en un único tipo celular, o tipo de tejido u órgano. Entre los tejidos y órganos ejemplificativos que pueden mostrar daños se incluyen el tejido epidérmico o mucoso, tracto gastrointestinal, intestino, páncreas, timo, hígado, riñón, bazo, piel o una articulación esquelética (por ejemplo rodilla, tobillo, cadera, hombro, muñeca, dedo de la mano o del pie, o codo). El tratamiento según la invención puede resultar en la reducción, inhibición o bloqueo de la progresión o agravamiento del daño a los tejidos, o conducir a la regeneración de un órgano o tejido dañado, por ejemplo la piel, una mucosa o el hígado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", y variaciones gramaticales de los mismos, se refieren a un protocolo, régimen, procedimiento o remedio realizado en un sujeto o paciente individual, en el que se desea obtener un efecto o resultado fisiológico en dicho paciente. Por lo tanto, entre los procedimientos de la invención se incluyen, entre otros, los procedimientos de tratamiento y terapéuticos que proporcionan una mejora o efecto beneficioso medible en un trastorno, enfermedad, condición fisiológica, patología o en un síntoma en un sujeto dado. Una mejora o efecto beneficioso medible es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria, temporal o duradera de un trastorno, enfermedad, condición fisiológica, patología o síntoma, o una reducción de la aparición, gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso asociado o causado por el trastorno, enfermedad, condición fisiológica, patología o condición. Un procedimiento de la invención no es necesario que tenga efecto de manera inmediata y puede producirse cierto retraso, aunque con el tiempo en un sujeto dado se producirá una mejora o efecto beneficioso, estabilización o alivio.

Un resultado clínico satisfactorio de un tratamiento de acuerdo con la invención se consigue, por ejemplo, en el caso de que se produzca una disminución o reducción progresiva o parcial de la gravedad, duración o frecuencia de una o más patologías, síntomas adversos o complicaciones, asociadas al trastorno, enfermedad, patología o condición, o la inhibición, reducción, bloqueo o reversión de una o más de las manifestaciones o características fisiológicas, patológicas, bioquímicas o celulares del trastorno, enfermedad, condición fisiológica, patología o síntoma (por ejemplo una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, EICH, rechazo del trasplante, inflamación o un trastorno autoinmunitario). Por lo tanto, un beneficio o mejora terapéutico podría ser pero no es necesariamente una curación o anulación de la mayoría o de la totalidad de las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociados o causados por el trastorno, enfermedad, condición fisiológica, patología o síntoma (por ejemplo una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, EICH, rechazo del trasplante, inflamación o un

trastorno autoinmunitario). De esta manera, un beneficio o mejora terapéutico no resultará necesariamente en una curación completa de cualquiera o de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas o causadas por el trastorno, enfermedad, condición fisiológica o patología (por ejemplo una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, EICH, rechazo del trasplante, inflamación o un trastorno autoinmunitario). Por ejemplo,

- 5 la reducción parcial, disminución o inhibición, o una estabilización o el enlentecimiento de la progresión o el agravamiento de una patología, síntoma adverso o complicación asociada o causada por el trastorno, enfermedad, condición fisiológica o patología (por ejemplo una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, EICH, rechazo del trasplante, inflamación o un trastorno autoinmunitario), aunque sea sólo durante unos cuantos días, semanas o meses, o incluso si persiste una o más patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas o causadas por la enfermedad, trastorno, patología o condición (por ejemplo una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, EICH, rechazo del trasplante, inflamación o un trastorno autoinmunitario) es un resultado clínico satisfactorio.

En diversas formas de realización particulares de la divulgación, entre los procedimientos de tratamiento se incluyen el alivio o mejora de uno o más síntomas o consecuencias (físicos) adversos asociados a un trastorno o enfermedad inmunitario crónico o agudo. En diversas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, entre los procedimientos de tratamiento se incluyen reducir, disminuir o impedir la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversos asociados a la enfermedad del injerto contra el huésped (por ejemplo pérdida de peso, pérdida de pelo, erupciones cutáneas,

- 20 hematuria, hidroperitoneo, infiltrados de células inflamatorias en el hígado, tracto intestinal o pulmón, y la muerte), o resultan en una remisión o regresión de la enfermedad del injerto contra el huésped, o resultan en la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped. En diversas formas de realización particulares adicionales de la divulgación, entre los procedimientos de tratamiento se incluyen reducir, disminuir o impedir la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversos asociados al trasplante o rechazo del injerto (por ejemplo una respuesta inmunitaria contra el trasplante o injerto, o la destrucción del trasplante o células del injerto), o resultan en una remisión o regresión del trasplante o rechazo del injerto, o resultan en la prevención del rechazo del trasplante o injerto. En diversas formas de realización particulares todavía adicionales de la divulgación, entre los procedimientos de tratamiento se incluyen reducir, disminuir o impedir la aparición, frecuencia, duración o gravedad de uno o más síntomas o consecuencias físicas adversas asociadas a la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes (por ejemplo la diabetes mellitus insulino-dependiente, DMID, diabetes de tipo I), la enfermedad de Crohn (EC), la enfermedad intestinal inflamatoria (EI), la colitis ulcerosa (CU), la enfermedad celíaca, la soriasis, el lupus eritematoso sistémico (LES), la nefritis del lupus proliferativa, la miopatía granulomatosa, la polimiositis, o una respuesta celular mediada por OX40 que no resulta deseable o es aberrante.

- 25 30 35 En diversas formas de realización particulares todavía adicionales de la divulgación, entre los procedimientos de tratamiento se incluyen reducir el número o proliferación de las células autorreactivas o de las células productoras de anticuerpos antiautoproteínas, inhibiendo o bloqueando un incremento del número, proliferación o supervivencia de las células autorreactivas o de las células productoras de anticuerpos anti-autoproteínas.

En el caso de un trastorno o enfermedad inmunitaria, una mejora o efecto beneficioso medible incluye modular el número, la proliferación o una actividad de los linfocitos (por ejemplo las células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas) hacia niveles de línea base fisiológicamente normales y se considera un resultado de tratamiento satisfactorio. Un ejemplo adicional de una mejora o efecto beneficioso medible para un trastorno inmunitario o una enfermedad inmunitaria es una mejora en un cambio histopatológico causado o asociado al trastorno o enfermedad inmunitaria. Por ejemplo, bloquear la progresión o reducir la infiltración en articulaciones esqueléticas o destrucción de tejidos, o la infiltración o destrucción de tejido en páncreas, timo, riñón, hígado, bazo, tejido epidérmico (piel) o mucoso, tracto digestivo o intestino.

De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos de bloqueo, inhibición, prevención, reducción o disminución de la unión de un ligando de OX40 (OX40L) a células T activadas o a OX40, *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye poner en contacto células T activadas con un anticuerpo de OX40 eficaz para inhibir o impedir la unión de un ligando de OX40 a las células T activadas. En otra forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye poner en contacto OX40 con un anticuerpo de OX40 eficaz para inhibir o impedir la unión de un ligando de OX40 a OX40. En aspectos particulares de la divulgación, se lleva a cabo un procedimiento en un sujeto que requiere el bloqueo, reducción, disminución, inhibición o prevención de la unión de un ligando de OX40 (OX40L) a células T activadas, opcionalmente con una composición farmacéutica de OX40.

De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos para modular la señalización celular mediada por OX40, *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye administrar en un sujeto que necesita modular la señalización celular mediada por OX40, un anticuerpo de OX40 eficaz para modular la señalización celular mediada por OX40.

De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye la administración en el sujeto que requiere un número reducido de células T efectoras, de

memoria o reguladoras activadas, de una cantidad de anticuerpo de OX40 suficiente para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas.

- 5 De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos de tratamiento de una enfermedad o trastorno causada por células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye la administración en un sujeto de una cantidad de un anticuerpo de OX40 suficiente para reducir, disminuir o bloquear la progresión de la enfermedad o trastorno causado por células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas, o para reducir el número de células T efectoras, de memoria o reguladoras activadas. En unos aspectos particulares de la divulgación, la enfermedad o trastorno comprende: la enfermedad del injerto contra el huésped, inflamación o un trastorno autoinmunitario.
- 10 De acuerdo con la divulgación, se proporcionan unos procedimientos para reducir el número de células T activadas en la sangre, bazo, nódulos linfáticos, intestinos, hígado, pulmón o piel en un sujeto. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye la administración en el sujeto de una cantidad de un anticuerpo de OX40 suficiente para reducir el número de células T activadas en la sangre, bazo, nódulos linfáticos, intestinos, hígado, pulmón o piel. En un aspecto de la divulgación, un procedimiento para reducir el número de células T activadas en la sangre, bazo, nódulos linfáticos, intestinos, hígado, pulmón o piel es en un modelo de enfermedad de injerto contra huésped aguda o crónica.
- 15 20 Las composiciones y procedimientos de la divulgación pueden combinarse con cualquier otro tratamiento o terapia que proporcione un efecto deseado. En particular, son aplicables tratamientos y terapias que se han caracterizado como que presentan un efecto complementario o sinérgico. Entre los tratamientos y terapias ejemplificativas se incluyen agentes o fármacos inmunosupresores. Dichos tratamientos y terapias inmunosupresores pueden llevarse a cabo antes o de manera sustancialmente contemporánea con otros procedimientos de la divulgación, por ejemplo un tratamiento o terapia.
- 25 30 La divulgación proporciona por lo tanto unos procedimientos de combinación en los que los procedimientos de la divulgación se utilizan en una combinación con cualquier régimen terapéutico, protocolo de tratamiento o composición, tal como un protocolo, agente o fármaco inmunosupresor indicado en la presente memoria o conocido de la técnica. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye administrar un anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento del mismo, y un tratamiento, agente o fármaco inmunosupresor. El tratamiento, agente o fármaco inmunosupresor puede administrarse antes, de manera sustancialmente contemporánea o tras la administración de anticuerpo de OX40, o subsecuencia o fragmento del mismo en un sujeto.
- 35 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunosupresor" o variaciones gramaticales del mismo, utilizado en referencia a un tratamiento, terapia, agente o fármaco se refiere a que el tratamiento, terapia, agente o fármaco proporciona una reducción, disminución, inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria, humoral o celular. Dichas terapias pueden suprimir la respuesta inmunitaria, generalmente o sistémicamente, o suprimir la respuesta inmunitaria en una región o localización específica.
- 45 50 Entre las clases no limitativas específicas de agentes y fármacos inmunosupresores se incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, extractos vegetales, alcaloides vegetales, nitrosoureas, hormonas (esteroides, tales como glucocorticoides), nucleósidos y análogos de nucleótido. Entre los ejemplos específicos de fármacos inmunosupresores se incluyen ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, tacrolimus (FK506), rapamicina, metotrexato, FTY720, inhibidores de cox-2 e itnerleucinas (por ejemplo IL-12).
- 55 Los anticuerpos policionales y monocionales son un ejemplo particular de un tratamiento o terapia inmunosupresor. Entre los anticuerpos inmunosupresores se incluyen, por ejemplo, infliximab (Remicade®), Rituxan®, Atgam® y Thymoglobuline®, Xenapax®, Simulect®, Humira®, Raptiva®, Tysabri® y Orthoclone® (OKT3).
- 60 Entre los procedimientos de la divulgación se incluyen además, entre otros, procedimientos que resultan en una menor necesidad o uso de otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico, procedimiento o remedio. Por ejemplo, para la inflamación, la EICH o un trastorno autoinmunitario, un procedimiento de la divulgación presenta un beneficio terapéutico en el caso de que en un sujeto dado resulte una dosis menos frecuente o reducida o la eliminación de un tratamiento o terapia inmunosupresor.
- 65 De esta manera, de acuerdo con la divulgación se proporcionan procedimientos para reducir la necesidad o uso de un tratamiento o terapia inmunosupresor. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye administrar un anticuerpo de OX40, fragmento o subsecuencia del mismo en un sujeto que está sometido o ha sido sometido a terapia inmunosupresora. En un aspecto de la divulgación, un procedimiento incluye administrar un anticuerpo de OX40, fragmento o subsecuencia del mismo en una cantidad eficaz para reducir la dosis, frecuencia o duración o que elimine la necesidad de un tratamiento o terapia inmunosupresor de la inflamación, la EICH o un trastorno autoinmunitario. Los procedimientos pueden llevarse a cabo antes, de manera sustancialmente contemporánea o después de la administración de un tratamiento o terapia inmunosupresor.

Las dosis o "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" en un procedimiento de tratamiento o terapia en el que se dese conseguir un beneficio o mejora terapéutico incluye, por ejemplo, cualquier alivio o mejora objetivo o subjetivo de una, varias o todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociados o causados por la enfermedad, trastorno o patología diana, o un síntoma adverso o complicación, en un grado medible o detectable. La prevención, 5 inhibición o retraso de una progresión o del agravamiento de la enfermedad, trastorno o patología diana, o de un síntoma adverso o complicación también es un resultado satisfactorio. Una cantidad suficiente o una cantidad eficaz se refiere a suficiencia o eficacia en un sujeto particular, no un grupo de sujetos o la población general. De esta manera, la "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" será suficiente para proporcionar un efecto terapéutico en 10 un sujeto dado.

Una cantidad suficiente o una cantidad eficaz puede proporcionarse aunque no necesariamente en una única administración y puede, aunque no necesariamente, administrarse sola o en combinación con otro tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede incrementarse proporcionalmente tal como indique 15 la necesidad del sujeto, el estado del trastorno, la enfermedad o condición tratada o los efectos secundarios del tratamiento. Además, una cantidad suficiente o una cantidad eficaz no es necesario que resulte suficiente o eficaz en caso de administrarse en una única dosis o en múltiples dosis sin un segundo tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que pueden incluirse dosis o cantidades adicionales, o una duración superior y posterior a dichas dosis, o tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos adicionales para que resulten eficaces o suficientes en 20 un sujeto dado. Las cantidades consideradas eficaces o suficientes incluyen además cantidades que resultan en una reducción de la utilización de otro tratamiento, régimen terapéutico o protocolo.

Las cantidades (dosis) no limitativas ejemplificativas se encuentran comprendidas en un intervalo de entre 25 aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg y cualquier valor o intervalo numérico o valor comprendido dentro de dichos intervalos. Pueden administrarse cantidades (dosis) superiores o inferiores, por ejemplo 0,01 a 500 mg/kg, y cualquier valor o intervalo numérico o valor comprendido dentro de dichos intervalos. Las cantidades (dosis) no limitativas ejemplificativas adicionales se encuentran comprendidas entre 30 aproximadamente 0,5 y 50 mg/kg, entre 1,0 y 25 mg/kg, entre 1,0 y 10 mg/kg, y cualquier valor o rango numérico o valor comprendido dentro de dichos intervalos.

Los procedimientos de la divulgación pueden ponerse en práctica mediante cualquier modo de administración o dosificación, o por cualquier vía, administración o dosificación sistémica, regional y local. Entre las vías ejemplificativas de administración y dosificación se incluyen las vías intravenosa, intraarterial, intradérmica, 35 intramuscular, subcutánea, intrapleural, transdérmica (tópica), transmucosa, intracraeal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (alimentaria) y mucosa.

Los procedimientos de la divulgación pueden ponerse en práctica una o más veces (por ejemplo 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 35 veces) al día, semana, mes o año. El experto en la materia conocerá en qué momento resulta apropiado retrasar o interrumpir la administración. Un programa de administración no limitativo es 1 a 7 veces a la semana, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más semanas, y cualquier valor o intervalo numérico, o valor comprendido dentro de dichos intervalos.

Evidentemente, tal como resulta típico para cualquier tratamiento o terapia, diferentes sujetos mostrarán diferentes 40 respuestas al tratamiento y algunos podrían no responder o responder inadecuadamente a un protocolo, régimen o procedimiento de tratamiento particular. Por lo tanto, las cantidades eficaces o suficientes dependerán por lo menos en parte de la enfermedad, trastorno, patología tratada (por ejemplo inflamación, EICH, rechazo del trasplante o un trastorno autoinmunitario, y si está en estadio avanzado, tardío o temprano), el efecto terapéutico deseado, así como el sujeto individual (por ejemplo la biodisponibilidad en el sujeto, el género, la edad, etc.) y la respuesta del sujeto al tratamiento o terapia, que se basará, en parte, en la variabilidad genética y epigenética (por ejemplo la farmacogenómica). Además, debido a cada sujeto o paciente tratado puede no responder a un 45 tratamiento o procedimiento terapéutico, protocolo, régimen, procedimiento o remedio particular, los procedimientos de tratamiento o terapéuticos no resultan necesarios para conseguir una mejora o efecto beneficioso, resultado clínico o resultado deseado medible particular, en todos y cada uno de los sujetos o pacientes o en una población dada tratada de esta manera. De acuerdo con lo anterior, un sujeto o paciente, o población dado puede no responder, responder inadecuadamente o puede mostrar respuestas no deseables, tales 50 como un efecto secundario, a un procedimiento de tratamiento o terapéutico de la invención.

Los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan intercambiablemente en la presente memoria y se refieren a animales, 55 típicamente mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (gorila, chimpancé, orangután, macaco, gibón), animales domésticos (perro y gato), animales de granja y ganadería (caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo), animales de laboratorio y experimentales (ratón, rata, conejo, cobaya). Entre los sujetos se incluyen animales modelo de enfermedad (por ejemplo tales como ratones, ratas y primates no humanos) para el estudio de la eficacia in vivo (por ejemplo un modelo animal de EICH). Entre los sujetos humanos se incluyen niños, por ejemplo, neonatos, bebés, niños pequeños y adolescentes, entre las edades de 1 y 5, 5 y 10, y 10 y 18 años, adultos de edades comprendidas entre 18 y 60 años, y personas de edad avanzada, por ejemplo de edades comprendidas entre 60 y 65, entre 65 y 70, y entre 70 y 100 años.

Entre los sujetos se incluyen mamíferos (por ejemplo seres humanos) que requieren tratamiento, es decir, que presentan una enfermedad, trastorno, patología o síntoma de los mismos que es susceptible o que podría responder al tratamiento o terapia con un anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento. Entre los sujetos se incluyen los que presentan o están en riesgo de presentar un trastorno o enfermedad inmunitaria crónica o aguda, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria o una respuesta celular mediada por OX40. Entre los sujetos se incluyen además aquellos que son candidatos para el tratamiento o que han sido tratados para uno o más de entre: un trastorno o enfermedad inmunitaria crónica o aguda, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria o una respuesta celular mediada por OX40. De esta manera, un sujeto que es un candidato o que ha recibido un trasplante o injerto celular, de tejidos u órganos, o de médula ósea, células madre hematopoyéticas, células madre de sangre periférica o células madre de sangre umbilical, células alogénicas o no alogénicas, o células neurales, es un candidato para el tratamiento con un anticuerpo de OX40.

Entre los sujetos se incluyen además aquellos que requieren tratamiento o terapia inmunosupresor debido a un diagnóstico de laboratorio o clínico que justifique dicho tratamiento, sujetos sometidos a tratamiento o terapia inmunosupresor (por ejemplo debido a un trasplante) y sujetos que han sido sometidos a un tratamiento o terapia inmunosupresor, y que están en riesgo de recaída o recurrencia. Entre los sujetos de riesgo se incluyen aquellos con una historia familiar, predisposición genética o que han sufrido anteriormente de una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria o una respuesta celular mediada por OX40. Dichos sujetos de riesgo pueden ser identificados utilizando cribados, tales como células T autorreactivas o anticuerpos anti-autoproteínas. Por ejemplo, los sujetos que expresan factor reumatoide están en riesgo de artritis reumatoide. Los sujetos que expresan anticuerpos contra PBM, GOM o PPL están en riesgo de esclerosis múltiple.

Por lo tanto, los sujetos de riesgo pueden tratarse con el fin de inhibir o reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, o una respuesta celular mediada por OX40, o que sufren de una recaída o recurrencia de una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitario o una respuesta celular mediada por OX40. El resultado de dicho tratamiento puede ser reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad autoinmunitaria, o una respuesta celular mediada por OX40.

Los anticuerpos, ácidos nucleicos y otras composiciones y procedimientos de la divulgación pueden incluirse dentro de formulaciones farmacéuticas o utilizarlas. Dichas formulaciones farmacéuticas resultan útiles para el tratamiento, administración o dosificación en un sujeto *in vivo* local, regional o sistémicamente, o *ex vivo*.

Entre las formulaciones farmacéuticas se incluyen portadores, diluyentes o excipientes "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables". Entre las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" se incluyen solventes (acusos o no acusos), soluciones, emulsiones, medios de dispersión, recubrimientos, isotónicos y estimuladores de la absorción o agentes retardantes, compatibles con la administración farmacéutica. Dichas formulaciones pueden estar contenidas en un líquido, emulsión, suspensión, jarabe o elixir, o forma sólida, tableta (recubierta o no recubierta, de liberación inmediata, retardada, continua o pulsátil), cápsula (dura o blanda, de liberación inmediata, retardada, continua o pulsátil), polvos, gránulos, cristales o microperlas. También pueden incorporarse en las formulaciones compuestos complementarios (por ejemplo conservantes, agentes antibacterianos, antivíricos y antifúngicos).

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse para ser compatibles con una vía de administración o dosificación local, regional o sistémica particular. De esta manera, entre las formulaciones farmacéuticas se incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por vías particulares. Son ejemplos no limitativos específicos de vías de administración para composiciones de la invención, las vías parenteral, por ejemplo intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intrapleural, transdérmica (tópica), transmucosa, intracraneal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (alimentaria), administración mucosa, y cualquier otra formulación adecuada para el procedimiento de tratamiento o el protocolo de administración.

Entre las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluirse: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilén-diamina-tetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

Entre las formulaciones farmacéuticas para inyección se incluyen soluciones acuosas estériles (en caso de ser solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, entre los portadores adecuados se incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con

- fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. Entre los agentes antibacterianos y antifúngicos se incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico. La inclusión de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina, puede prolongar la absorción de las composiciones inyectables.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Pueden prepararse formulaciones inyectables estériles mediante la incorporación de la composición activa en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente indicados. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación de la composición activa en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, entre los procedimientos de preparación se incluyen, por ejemplo, el secado al vacío y la liofilización, que rinde unos polvos del ingrediente activo 'mas cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente preparada de los mismos.
- Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados a la barrera que debe permearse. Dichos penetrantes son conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, para la administración mucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo mediante la utilización de sprays nasales, dispositivos de inhalación (por ejemplo aspiradores) o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, cremas o parches.
- Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse con portadores que protegen frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada o un material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo. Las formulaciones también pueden administrarse utilizando artículos fabricados, tales como implantes y sistemas de administración microencapsulados para conseguir la administración local, regional o sistémica o la liberación controlada o sostenida.
- Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliorthoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos de preparación de dichas formulaciones son conocidos por el experto en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation (Palo Alto, CA). También pueden utilizarse suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas con diana en células o tejidos utilizando anticuerpos o proteínas de cubierta vírica) como portadores farmacéuticamente aceptables. Pueden prepararse según procedimientos conocidos, por ejemplo tal como se indica en la patente US nº 4.522.811.
- Las formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración son conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7a ed., Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 1999; Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, 3a ed., 2000, y Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technicon Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., 1993).
- Las composiciones utilizadas de acuerdo con la divulgación, incluyendo anticuerpos de OX40, ácidos nucleicos, tratamientos, terapias, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas, pueden empaquetarse en una forma de administración unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La expresión "forma de administración unitaria" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como tratamiento de dosis unitarias; cada unidad contiene una cantidad de la composición asociada con el portador, excipiente, diluyente o vehículo calculado para producir el tratamiento o efecto terapéutico (por ejemplo beneficioso) deseado. Las formas de administración unitarias dependerán de una diversidad de factores, incluyendo, aunque no necesariamente limitadas a, la composición particular utilizada, el efecto que debe conseguirse y la farmacodinámica y farmacogenómica del sujeto que debe tratarse.
- La divulgación proporciona además kits, incluyendo anticuerpos de OX40, ácidos nucleicos, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas, empaquetadas en material de envasado adecuado, opcionalmente en combinación con instrucciones para utilizar los componentes del kit, por ejemplo instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la divulgación. En una forma de realización de la divulgación, un kit incluye un anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento, e instrucciones para detectar OX40. En otra forma de realización de la divulgación, un kit incluye un anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento, e instrucciones para tratar un sujeto que requiere tratamiento (por ejemplo un sujeto que presenta una enfermedad, trastorno, patología o condiciones susceptibles de responder o que pueden responder al tratamiento o terapia) con el anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento. En un aspecto de la divulgación, las instrucciones son para tratar una enfermedad o trastorno inmunitario crónico o agudo, inflamación, EICH, rechazo del trasplante, inflamación, una enfermedad

autoinmunitaria o una respuesta celular mediada por OX40. En otros aspectos de la divulgación, un kit incluye un tratamiento, terapia o agente inmunosupresor.

- 5 La expresión "material de envasado" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes bajo condiciones estériles y puede estar realizado en material utilizado comúnmente para dichos fines (por ejemplo papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o instrucciones en el envase pueden incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo un procedimiento diagnóstico o de tratamiento de la invención. Por lo tanto, las instrucciones pueden incluir instrucciones para la puesta en práctica de cualquiera de los procedimientos de la divulgación descritos en la presente memoria. De esta manera, en diversas formas de realización, un kit incluye una etiqueta o unas instrucciones en el paquete que incluyen instrucciones para poner en práctica un procedimiento de la divulgación en solución, in vitro, in vivo o ex vivo. En un aspecto, las instrucciones incluyen administrar o dosificar el anticuerpo de OX40, subsecuencia o fragmento, en un sujeto local, regional o sistémicamente, en el procedimiento de tratamiento o terapéutico de la divulgación.
- 10 15 Las instrucciones pueden incluir adicionalmente indicaciones de un resultado clínico satisfactorio o cualesquiera síntomas adversos o complicaciones que pueden producirse. Las instrucciones pueden incluir además información para el almacenamiento, data de caducidad, o cualquier información requerida por las agencias reguladoras, tal como la Food and Drug Administration, para la utilización en un sujeto humano.
- 20 25 30 Las instrucciones pueden encontrarse sobre "material impreso", por ejemplo sobre papel o cartón dentro del kit, sobre una etiqueta fijada al kit o material de envasado, o adherida a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender un medio de audio o vídeo y adicionalmente estar incluidas en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disco extraíble o disco duro), CD óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenamiento electrónico, tal como RAM y ROM, e híbridos de los mismos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.
- 35 Los kits de la divulgación pueden incluir adicionalmente un agente tamponador, un conservante o un agente estabilizador. El kit puede incluir además componentes de control para someter a ensayo la actividad, por ejemplo una muestra de control o un estándar. Cada componente del kit puede estar incluido dentro de un envase individual o en una mezcla, y todos los diversos envases pueden encontrarse dentro de un único paquete o en múltiples paquetes.
- 40 45 50 De acuerdo con la divulgación se proporcionan además unos procedimientos de cribado, detección e identificación de OX40 sin células (por ejemplo en solución o en fase sólida) y celulares (por ejemplo in vitro o in vivo). Los procedimientos pueden llevarse a cabo en solución, in vitro utilizando un material o muestra biológico, e in vivo, por ejemplo una muestra de células (por ejemplo linfocitos) procedentes de un animal. En una forma de realización de la divulgación, un procedimiento incluye poner en contacto un material o muestra biológico con un anticuerpo que se une a OX40 bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo de OX40, y someter a ensayo para la unión del anticuerpo a OX40. La unión del anticuerpo a OX40 detecta la presencia de OX40. En un aspecto de la divulgación, OX40 se encuentra presente sobre una célula o tejido. En otro aspecto de la divulgación, el material o muestra biológico se obtiene de un sujeto mamífero.
- 55 60 65 La expresión "poner en contacto" utilizada en referencia a una composición, tal como una proteína (por ejemplo el anticuerpo de OX40), material, muestra o tratamiento, se refiere a una interacción directa o indirecta entre la composición (por ejemplo el anticuerpo de OX40) y la otra entidad referenciada. Un ejemplo particular de interacción directa es la unión. Un ejemplo particular de una interacción indirecta es aquella en la que la composición actúa sobre una molécula intermediaria, que a su vez actúa sobre la entidad referenciada. De esta manera, por ejemplo, poner en contacto una célula (por ejemplo un linfocito) con un anticuerpo de OX40 incluye permitir que el anticuerpo se una a la célula (por ejemplo mediante la unión a OX40) o permitir que el anticuerpo actúe sobre un intermediario que a su vez actúa sobre la célula.
- Las expresiones "someter a ensayo" y "medir" y variaciones gramaticales de las mismas se utilizan intercambiablemente en la presente memoria y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas, o a determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas. En el caso de que las expresiones se utilicen en referencia a la unión, se encuentran contemplados cualesquiera medios de evaluación de la cantidad relativa, afinidad o especificidad de la unión, incluyendo los diversos procedimientos indicados en la presente memoria y conocidos de la técnica. Por ejemplo, la unión del anticuerpo de OX40 a OX40 pueden someterse a ensayo o medirse mediante un ensayo ELISA.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el entendido por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la invención. Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, en la presente memoria se indican los procedimientos y materiales adecuados.

Todas las publicaciones, patentes, números de acceso de GenBank y otras referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluyendo las definiciones.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un" o "una" y "el" o "la" incluyendo los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, las referencias a "un anticuerpo" incluyen una pluralidad e anticuerpos y las referencias a "un tratamiento o terapia" pueden incluir los tratamientos o terapias múltiples, secuenciales o simultáneos, etc.
- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen los números enteros comprendidos dentro o incluidos en dichos intervalos y las fracciones de los valores o los números enteros comprendidos dentro o incluidos en los intervalos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 90% a 100%, incluye 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, etc., así como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc., y de esta manera sucesivamente. En otro ejemplo, la referencia a un intervalo de 1 a 5.000 veces incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veces, etc., así como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 veces, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 veces, etc., y de esta manera sucesivamente.
- 15
- 20 La invención se da a conocer de manera general en la presente memoria utilizando oraciones afirmativas para describir las numerosas formas de realización. La invención incluye específicamente asimismo unas formas de realización en las que se excluye el objeto particular, en su totalidad o en parte, tal como sustancias o materiales, etapas de procedimiento y condiciones, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Por lo tanto, aunque la invención no está generalmente expresada en la presente memoria desde el punto de vista de lo que la invención no incluye, son divulgados sin embargo unos aspectos que no están incluidos de manera explícita en la invención.
- 25
- 30 Se han descrito varias formas de realización de la invención. En conformidad, los ejemplos a continuación se proporcionan a título ilustrativo pero no limitativo del alcance de la invención tal como se describe en las reivindicaciones.

## 30 **Ejemplos**

### 35 **Ejemplo 1**

El presente ejemplo describe diversos materiales y métodos.

- 35 Preparación de antígenos: se aisló ARN a partir de células mononucleares de sangre periférica humana activadas durante dos días con fitohemaglutinina (PHA, Remel, Lenexa, KS) utilizando reactivo Tri (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). La secuencia codificante del dominio extracelular de OX40 humano se amplificó mediante reacciones en cadena de la polimerasa-transcripción inversa. El producto amplificado se secuenció y se confirmó que era idéntico a la secuencia publicada de la OX40 humana (documento nº WO95/12673, SEC ID nº 1). El producto se subclonó en el mismo marco dentro del plásmido baculovírico donante pfastbac-hFc. Este vector se generó a partir del plásmido pfastbac (Invitrogen Corp.) y la parte Fc de la IgG1 humana ("IgG1\_h"). La secuencia de la IgG1\_h se extrajo del vector pV11392.fc. Se generaron baculovirus recombinantes que codifican la proteína de fusión OX40 humano:IgG1\_h (OX40\_h:Fc\_h). Se infectaron células de insecto High-Five BTI-TN-5b1-4 ("Tn5") de *Trichoplusia ni* (Invitrogen Corp.) con el baculovirus recombinante OX40\_h:Fc\_h para la producción de proteínas. La secuencia de OX40 de longitud completa se amplificó y se clonó en el vector pCDNA3.1 (Invitrogen Corp.) para la expresión en células eucarióticas. Las células EL-4 (ATCC nº TIB-39) y CHO-K1 (ATCC nº CCL-61) se transfecaron utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen Corp.) y se seleccionaron los transfectantes estables utilizando higromicina B (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) o geneticina (Invitrogen Corp.), respectivamente. Se conjugó OX40\_h:Fc\_h con ovoalbúmina mediante acoplamiento con glutaraldehído. Se mezcló un mg de OX40\_h:Fc\_h con 0,5 mg de ovoalbúmina (Pierce, Rockford, IL) en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadieron lentamente 50 µl de glutaraldehído de grado EM al 1% (Sigma, St. Louis, MO) y se sometieron a agitación suave durante cinco minutos para mezclar la solución. Tras tres horas a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de etanolamina 1 M (pH 7) y la solución se incubó durante dos horas adicionales seguido de intercambio del tampón en una columna NAP10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por solución salina tamponada con fosfato.
- 40
- 45
- 50
- 55

Secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión OX40 humana:IgG1 humana entre el codón de inicio (ATG) pasando por el dominio extracelular de la OX40 humana hasta el final de la secuencia de Fc humana (subrayada), SEC ID nº 1:

## ES 2 938 625 T3

ATGTGCGTGG GGGCTCGCGC GCTGGGCCGC GGGCCGTGTG CGGCTCTGCT CCTCCTGGC	60
CTGGGGCTGA GCACCGTGAC GGGGCTCCAC TGTGTCGGGG ACACCTACCC CAGCAACGAC	120
CGGTGCTGCC ACGAGTGCAG GCCAGGCAAC GGGATGGTGA GCCGCTGCAG CCGCTCCCAG	180
AACACGGTGT GCCGTCCGTG CGGGCCGGC TTCTACAACG ACGTGGTCAG CTCCAAGCCG	240
TGCAAGCCCT GCACGTGGTG TAACCTCAGA AGTGGGAGTG AGCGGAAGCA GCTGTGCACG	300
GCCACACAGG ACACAGTCTG CCGCTGCCGG GCGGGCACCC AGCCCCTGGA CAGCTACAAG	360
CCTGGAGTTG ACTGTGCCCT CTGCCCTCCA GGGCACTTCT CCCCAGGCGA CAACCAGGCC	420
TGCAAGCCCT GGACCAACTG CACCTTGGCT GGGAAAGCACA CCCTGCAGCC GGCCAGCAAT	480
AGCTCGGACG CAATCTGTGA GGACAGGGAC CCCCCAGCCA CGCAGCCCCA GGAGACCCAG	540
GGCCCCCCGG CCAGGCCCAT CACTGTCCAG CCCACTGAAG CCTGGCCAG AACCTCACAG	600
GGACCCTCCA <u>GATCTTGTGA CAAAACTCAC ACATGCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC</u>	660
<u>CTGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTCCCC CAAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC</u>	720
<u>CGGACCCCTG AGGTACACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG</u>	780
<u>TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG</u>	840
<u>CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG</u>	900
<u>AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA</u>	960
<u>ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCCT GCCCCCATCC</u>	1020
<u>CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC</u>	1080
<u>AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG</u>	1140
<u>CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG</u>	1200
<u>AGCAGGGTGGC AGCAGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC</u>	1260
<u>CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA</u>	1320

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40 humano fusionado con la parte Fc de la IgG1 humana (subrayada), SEC ID nº 2:

MCVGARRLGR GPCA <del>ALLLLG</del> LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ	60
NTVCRPCPGF FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCR CR AGTQPLDSYK	120
PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTL A GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ	180
GPPAR PITVQ PTEAWPRTSQ GPSR <u>SCDKTH</u> TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS	240
<u>RTPEVTCVVV DVS</u> HEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL	300
<u>NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP</u>	360
<u>SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SR WQQGNVFS CSVMHEALHN</u>	420
<u>HYTQKSLSLS PGK</u>	433

- 5           Ratones: se obtuvieron ratones KM mice™ transchromosómicos humanos (documento nº WO 02/43478 y nº WO 02/092812, Ishida et al., IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2000; Kataoka S., IBC's 13th Antibody Engineering Meeting, resumen, 2002) que alojaban fragmentos cromosómicos humanos codificantes de la región de inmunoglobulina humana, de Kirin Brewery Co., Ltd., Japón, y se alojaron en las instalaciones animales de La Jolla Institute for Allergy and Immunology. Se proporciona una vista general de la tecnología de producción de anticuerpos humanos en Lonberg (Lonberg et al., Int. Rev. Immunol. 13(1):65-93, 1995). Se describen animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana (kappa o lambda) que no expresan inmunoglobulinas endógenas en, por ejemplo, la patente US nº 5.939.598. Se describen procedimientos adicionales para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos (ver, por ejemplo, los documentos nº WO 98/24893, nº WO 92/01047, nº WO 96/34096, nº WO 96/33735; patentes US nº 5.413.923, nº 5.625.126, nº 5.633.425, nº 5.569.825, nº 5.661.016, nº 5.545.806, nº 5.814.318, nº 5.885.793, nº 5.916.771 y nº 5.939.598). El desarrollo de bovinos portadores de genes de inmunoglobulina humana, vacas TC, se describe en Kuroiwa et al., Nat. Biotechnol. 20(9):889-94, 2002; Kuroiwa et al., Nat. Genet. 36(7):775-80, 2004).
- 10          Inmunización: se mezcló proteína recombinante OX40\_h:Fc\_h con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) y se preparó una emulsión. Los ratones se inmunicaron con 10 a 25 µg de proteína por vía intraperitoneal y recibieron un refuerzo intraperitoneal con 5 a 10 µg de proteína emulsificada en adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma) a intervalos de dos semanas durante 2 a 4 refuerzos. Se administró una inyección intraperitoneal final de 5 a 10 µg de OX40\_h:Fc\_h soluble sin adyuvante cinco días antes de la fusión.
- 15          Otro grupo de ratones fue inmunicado con OX40\_h:Fc\_h que se desnaturalizó por calor mediante incubación a 80°C durante diez minutos en PBS y después se mezcló 1:1 con adyuvante RIBI (Sigma). Los ratones se inmunicaron tal como se ha indicado anteriormente. Un tercer grupo de ratones fue inmunicado con OX40\_h:Fc\_h conjugado con ovoalbúmina. Los ratones fueron sensibilizados con 30 µg de OX40\_h:Fc\_h-OVA solo o en una mezcla con OX40\_h:Fc\_h, 10 µg y 20 µg, respectivamente, en RIBI. El primer recibió un refuerzo de 30 µg de OX40\_h:Fc\_h-OVA en RIBI, seguido de 10 µg de OX40\_h:Fc\_h en RIBI a intervalos de dos semanas. Se administró un refuerzo final de 20 µg de OX40\_h:Fc\_h-OVA en PBS cinco semanas después. Los dos refuerzos del último grupo consistieron de 5 µg de OX40\_h:Fc\_h-OVA + 10 µg de OX40\_h:Fc\_h en RIBI a intervalos de dos semanas, con un refuerzo final de 10 µg de OX40\_h:Fc\_h en PBS. Todas las inyecciones fueron intraperitoneales.
- 20          Un grupo final de ratones se inmunicó con células T humanas CD4+ que habían sido estimuladas durante dos días con PHA (1 µg/ml) y una interleucina-2 humana recombinante (IL2, 10 ng/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA). Antes de la inyección las células recibieron 25 Gy de irradiación de una fuente de cesio y se diluyeron 1:1 en adyuvante RIBI.
- 25          Producción de hibridoma: los ratones con el título más alto de anticuerpo IgG específico anti-OX40 en su suero se seleccionaron para la producción de anticuerpos monoclonales. Se recolectaron los bazo y se fusionaron suspensiones de células individuales con una estirpe celular de mieloma (SP2/O-Ag14) (ATCC, Rockville, MD) en una proporción de 3:1 con polietilenglicol al 50% (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Las fusiones se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad óptima y se cultivaron en medio DMEM-10 completo (medio 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%

(HCF, Biovaris, San Diego, CA) en un incubador a 37% con 10% de CO<sub>2</sub>. Se cribaron aproximadamente 4.000 pocillos de cuatro fusiones mediante ELISA para anticuerpos específicos de OX40 que contenían kappa humano. Los anticuerpos IgG humanos anti-OX40 humano se confirmaron mediante análisis de citometría de flujo. Los pocillos positivos se expandieron y se sometieron a tres a cuatro rondas de clonación por dilución limitante con el fin de obtener anticuerpos monoclonales.

Purificación de anticuerpos y proteínas: para la purificación de anticuerpos, los hibridomas se cultivaron en botellas de cultivo rotatorias de 2 litros en una proporción de 350 mililitros por cada botella de 1 litro o en 1 litro de Integra system (INTEGRA Bioscience, Inc., Ijamsville, MD) con hibridoma-medio SFM (Invitrogen Corp.) complementado con suero fetal bovino con contenido ultrabajo de IgG (Invitrogen Corp.). Se generó proteína recombinante OX40 humano:Fc\_h mediante la infección de 1 litro de células Tn5 durante cuatro días. Se purificaron anticuerpos monoclonales humanos y OX40:Fc\_h a partir del medio de cultivo utilizando gel de proteína A-sefarosa Fast Flow recombinante (Amersham Biosciences). El medio condicionado generado en las botellas de cultivo rotatorias en primer lugar se concentró utilizando un sistema de flujo tangencial Ultrapette (Pall Corp., East Hills, NY). El medio condicionado se filtró con una unidad de filtración de vacío de 0,22 µm (Amersham Biosciences) de tamaño apropiado para la cantidad de anticuerpo humano en el medio. La columna se lavó por completo 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 se agruparon las fracciones positivas y se concentraron con un concentrador centrífugo (Vivaspin, 50.000 PMCO, Sartorius, Gettingen, 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 diámetro de poro de 0,22 µm y se determinó la concentración de anticuerpo mediante el procedimiento de Lowry. Se determinó el contenido de pirógenos utilizando un ensayo de lisado de amebocitos *Limulus* ("LAL") (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Los límites de detección de este ensayo eran 0,06 EU/mg. En el caso de que el ensayo fuese negativo, las muestras se consideraron libres de endotoxinas.

ELISA de cuantificación de IgG humana: para determinar la cantidad de anticuerpo humano presente en los sobrenadantes y soluciones madre purificadas, se utilizó el protocolo siguiente. Se utilizó anticuerpo de cabra específico anti-Fcy humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) para recubrir placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) en tampón de carbonato a razón de 0,5 µg/pocillo durante una hora a 37°C. A continuación, se bloquearon las placas con Superblock (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos seguido de la adición de las muestras a las placas. Se generaron curvas estándares utilizando IgG humana total (Sigma) o IgG1 o IgG4 humana purificada (Kirin Brewery Co., Ltd.). Las placas se incubaron durante una hora a 37°C, se lavaron en PBS/BSA al 1%/Tween20 al 0,1% (Sigma) y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo de cabra específico anti-Fcy humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Jackson ImmunoResearch) durante una hora a 37°C. El sustrato de TMB (Sigma) se añadió durante 10 minutos y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LabChem Inc., Pittsburgh, PA). Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm en un lector de microplacas.

ELISA de detección de anticuerpos específicos de OX40: se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpos, especificidad y producción mediante hibridomas. En breve, se recubrieron placas de fondo redondo de 96 pocillos con 50 µl de OX40\_h:Fc\_h a una concentración de 5 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,4) durante la noche a 4°C o a 37°C durante una hora. Tras el lavado 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 una hora. Se diluyó el suero, el sobrenadante o el anticuerpo purificado, en tampón de bloqueo, se añadió a los pocillos y las placas se incubaron durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron cuatro 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 hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron y se añadió el sustrato TMB (Sigma) y se incubó a temperatura ambiente durante diez a treinta minutos. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LabChem) y se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas.

Citometría de flujo: se determinaron los títulos de anticuerpos, especificidad y afinidades de unión relativa mediante análisis de citometría de flujo utilizando transfectantes CHO-K1 de OX40 humano estables o CMS humanas activadas con PHA + IL2 durante tres días. Las células se lavaron una vez en tampón de tinción: PBS + FBS al 2% + NaN<sub>3</sub> al 0,1% + EDTA 10 mM, después se resuspendió en suero, sobrenadante o anticuerpos purificados en un volumen de 50 µl. Las células se incubaron con los anticuerpos sobre hielo durante veinte minutos, se lavaron dos veces en tampón de tinción y después se resuspendieron en un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con ficoeritrina. Se utilizaron dos anticuerpos diferentes: (1) IgG de cabra antihumano (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) o (2) anticuerpo de ratón anti-IgG humana (BD Pharmingen, San Diego, CA). Tras una incubación durante veinte minutos sobre hielo, las células se lavaron una vez y se fijaron diez minutos con paraformaldehído al 1%. Tras un lavado final, las células se resuspendieron en tampón de tinción y las muestras se adquirieron utilizando citómetros de flujo FACScan o FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA) y los datos se analizaron utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson Biosciences) o Flow Jo (TreeStar, Inc., San Carlos, CA). Las células T activadas también se tiñeron con el anticuerpo L106 de ratón anti-OX40 humano (Becton Dickinson), que se conjugó directamente con ficoeritrina o la unión del cual se detectó con anticuerpo anti-IgG de ratón-PE (Southern Biotechnology Associates).

- Ensayos de bloqueo de OX40L: para determinar si los anticuerpos anti-OX40 humanos podían bloquear la unión de OX40L a OX40 soluble, se utilizaron protocolos tanto de ELISA como de citometría de flujo. En el ELISA, se recubrieron placas Nunc de fondo redondo de 96 pocillos con OX40\_h:Fc\_h soluble recombinante a una concentración de 2 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,4) durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,1% y se añadió Superblock (Pierce) a los pocillos para bloquear la unión no específica. Los anticuerpos de ensayo se diluyeron a 1 µg/ml en PBS/Tween y se añadieron a las placas. Tras una incubación de una hora a 37°C, se añadió OX40L humano soluble recombinante etiquetado con FLAG (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) a los pocillos apropiados sin eliminar mediante lavado los anticuerpos anti-OX40. Tras una incubación de una hora, las placas se lavaron y se añadió a los pocillos un anticuerpo anti-FLAG conjugado con peroxidasa (Sigma), durante una hora a 37°C. Se añadió el sustrato TMB, tras diez minutos se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se leyeron los resultados a 450 nm utilizando un lector de microplacas. En el ensayo de citometría de flujo, se purificaron células T CD4+ humanas y se activaron con PHA+IL2 durante dos días. Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción y después se incubaron con cantidades crecientes de anticuerpos humanos anti-OX40 humano durante veinte minutos sobre hielo, de entre 0,005 y 50 µg/ml. A continuación, se añadió a las células OX40L-FLAG recombinante soluble. las células se lavaron y se incubaron con anti-FLAG conjugado con PE (Sigma). Tras otro lavado, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron en un FACScan o FACScalibur. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la DO o el porcentaje de positivos en la fórmula siguiente: % de inhibición=100-((muestra/unión máxima)\*100).
- Ensayos de bloqueo cruzado de anticuerpo anti-OX40: con el fin de determinar si los anticuerpos se unían al mismo "epítopo" de OX40 humano, se utilizó un protocolo de ELISA. Se recubrieron placas Nunc de ELISA de fondo redondo de 96 pocillos con los anticuerpos humanos anti-OX40 humano en tampón de carbonato a una concentración de 2 µg/ml durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron y después se bloquearon con PBS/BSA al 1%/Tween-20. A continuación, se preincubaron dos a 20 µg/ml de los anticuerpos humanos anti-OX40 humano y los anticuerpos L106 de ratón anti-OX40 humano (BD Biosciences, San Jose, CA), clon 315 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japón) o ACT35 (BD Pharmingen), con 2 µg/ml de proteína de fusión recombinante OX40 humano:Fc\_m (Alexis Corporation, San Diego, CA) durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se añadieron las combinaciones de anticuerpo-OX40:proteína Fc\_m a la placa y se incubaron durante una hora a 37°C. Tras tres lavados, se detectó OX40:Fc\_m unido con anticuerpo de oveja anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham Biosciences). El ELISA se completó tal como se ha indicado anteriormente. El porcentaje de inhibición se determinó utilizando la DO de cada muestra en la fórmula siguiente: % de inhibición=100-((muestra/unión máxima)\*100). Para determinar si dichos anticuerpos humanos anti-OX40 humano bloqueaban los anticuerpos de ratón anti-OX40 humano, se llevó a cabo una variación de dicho ELISA. El procedimiento era igual excepto en que los anticuerpos de ratón anti-OX40 humano se utilizaron para recubrir las placas y se preincubó 112V8, 112F32, 112Y131 y 112Z5 con OX40 humano:proteína Fc\_h. La unión de la proteína OX40 a los anticuerpos recubiertos se detectó con un anticuerpo secundario de oveja anti-IgG humana-peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences).
- También se utilizó un ensayo de citometría de flujo para determinar si los anticuerpos se bloquean cruzadamente entre sí. Se purificaron células T CD4 humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica tal como se ha indicado posteriormente y se activaron con 1 µg/ml de fitohemaglutinina (Remel, Lenexa, KS) y 10 ng/ml de interleucina-2 humana recombinante (BD Pharmingen) durante dos a tres días. Las células se lavaron y se marcaron con 10 µg/ml de los anticuerpos de ensayo durante treinta minutos sobre hielo en PBS complementado con suero de feto bovino al 2% y azida sódica al 0,1%. Sin lavado, se añadieron a los pocillos las versiones biotiniladas de los mismos anticuerpos a una concentración de 10 µg/ml y las células se incubaron durante otros treinta minutos sobre hielo. A continuación, las células se lavaron mediante la adición de tampón y se centrifugaron a 1.200 rpm durante tres minutos a 4°C. Se detectó la unión de los anticuerpos biotinilados mediante incubación con estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE, BD Pharmingen) durante veinte minutos seguido de otro lavado tal como se ha indicado. Las células se fijaron durante diez minutos en paraformaldehído al 1%. Tras un lavado final, las células se resuspendieron en tampón de tinción y las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo 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). Los anticuerpos sometidos a ensayo incluían 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131, 112Z5, anti-DNP (control negativo para IgG1 humana), anticuerpos de ratón anti-OX40 humano, clon L106, clon 315 y clon ACT35. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula siguiente: 100-(media geométrica de anticuerpo de ensayo/máx. de media geométrica)\*100. Los anticuerpos se sometieron a ensayo para la inhibición de la unión de ellos mismos, así como de la unión entre ellos.
- Purificación de CMSp humanas a partir de sangre completa: se recolectó sangre completa de donantes años de entre 18 y 50 años de edad en el programa habitual de donantes de sangre del Scripps Green Hospital (La Jolla, CA). Se añadió heparina para evitar la coagulación. No se especificó la raza, etnicidad o género. La sangre se diluyó en PBS y después se aplicó una capa inferior de Ficoll-Plaque Plus (Amersham Biosciences). Se separaron las células mononucleares del suero y las plaquetas mediante centrifugación a 1.800 rpm sin freno. La interfaz que contenía las CMSp se recolectó y se lavó dos veces con PBS.
- Purificación de las células T CD4+: se purificaron células T CD4+ humanas utilizando un kit de aislamiento negativo de Miltenyi Biotec. (Auburn, CA). Las CMSp se marcaron con la mezcla de anticuerpos conjugados con hapteno

específica para CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56 durante quince minutos a 4°C en PBS/BSA al 0,5%/EDTA 2 mM. Tras lavar dos veces, las células se resuspendieron en las perlas magnéticas anti-hapteno (perlas MACS) y las células se incubaron a 4°C durante quince minutos. A continuación, las células se lavaron y se aplicaron a una columna LS/VS+ que había sido prelavada e insertada en el imán. La columna se lavó tres veces con tampón. Las células CD4+ "intactas" estaban contenidas en el eluado de la columna. Se confirmó la pureza mediante análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para CD3 humana y CD4 humana, ambos directamente conjugados con fluorocromos (BD Pharmingen). Alternativamente, se seleccionaron positivamente las células T CD4+ con microperlas de CD4 (Miltenyi Biotec.). El procedimiento fue similar al descrito anteriormente, excepto en que las células que se adherían a la columna fueron eluidas retirando la columna del imán y forzando 5 ml de tampón a través de la columna con un émbolo.

**Ensayo de reacción de linfocitos mixtos:** se purificaron CMSP de dos donantes y se añadieron  $1 \times 10^5$  células de cada donante a una placa con fondo en U de 96 pocillos en presencia o en ausencia de anticuerpos humanos anti-OX40 humano o IgG4 humano de control negativo (anticuerpo anti-albúmina sérica humana, Kirin Brewery Co., Ltd.) (Ukyo et al., Immunology 109(2):226, 2003). Se sometieron a ensayo anticuerpos a una concentración de entre 0,005 y 100 µg/ml, dependiendo del estudio. Se sometieron a ensayo múltiples parejas de donantes. Los medios utilizados fueron RPMI-1640 complementado con suero AB humano al 10% (MP Biomedical, Irvine, CA), penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptopetanol. El día seis, se añadió 1 µCi de timidina tritiatada ( $^{3}\text{HTdR}$ ) a cada pocillo durante las últimas dieciocho horas de cultivo. Se lisaron las células y se transfirieron a filtros de fibra de vidrio, y se realizaron mediciones con un contador de centelleo (Wallac, Turku, Finlandia).

**Modelo *in vivo* de enfermedad de injerto contra huésped aguda:** en ratones macho con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) de cinco a diez semanas de edad se inyectaron 20 µg de anticuerpo de rata anti-cadena β de receptor de IL2 de ratón (TMβ1, Tanaka et al., J. Exp. Med. 178(3):1103-7, 1993) para reducir el número de células asesinas naturales endógenas. Al día siguiente, los ratones recibieron 2,5 Gy de irradiación utilizando una fuente de cesio. Cuatro horas después, los ratones recibieron 10 millones de CMSP humanas totales en PBS mediante inyección intraperitoneal seguido inmediatamente de la inyección intravenosa de anticuerpos humanos anti-OX40 humano o IgG1\_h de control negativo (anti-dinitrofenol (anti-DNP), Kirin Brewery Co., Ltd.) a una concentración de 2, 20, 100 o 200 µg en 100 µl de PBS. Alternativamente, se retrasó el tratamiento con anticuerpos hasta el día tres o seis para someter a ensayo el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-OX40. Se pesaron los ratones cada tres a cuatro días y recibieron anticuerpos anti-IL2Rβ semanalmente. El día doce, se sacrificaron los ratones y se evaluó la patología macroscópica. Se extirparon los bazo para el análisis de citometría de flujo, los hígados y los intestinos para la histología, y se recolectó suero para el análisis de las citocinas y anticuerpos humanos (Watanabe et al., Clin. Immunol. 120:247, 2006).

**Modelo *in vivo* de enfermedad del injerto contra el huésped crónica:** se adaptó un modelo de EICH crónica a partir del modelo de EICH xenogénica aguda (Watanabe et al., Clin. Immunol. 120:247, 2006). Se indujo la enfermedad mediante la transferencia de células T CD4 humanas seleccionadas positivamente en ratones SCID que habían sido preparados de la manera indicada anteriormente. Los ratones recibieron un millón de células T CD4 seleccionadas positivamente, mediante inyección intraperitoneal los días 0 y 2; 20 o 100 µg de anticuerpos anti-OX40 o de control mediante inyección intravenosa semanal desde el día 0. La enfermedad era manifiesta para el día treinta y los ratones fueron evaluados el día cuarenta y ocho. Se extirparon los bazo y nódulos linfáticos para la citometría de flujo, la piel y pulmones para la histología, y el suero para el análisis de las citocinas humanas.

**Análisis de citocinas humanas:** se midió un panel de ocho citocinas humanas en el suero de ratón utilizando tecnología multiplex y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

**Purificación de células asesinas naturales humanas:** se purificaron células asesinas naturales ("NK") humanas utilizando un kit de aislamiento negativo de Miltenyi Biotec. (Auburn, CA). Las CMSP se marcaron con mezcla e anticuerpos conjugados con biotina específico para células T, células B, células madre, células dendríticas, monocitos, granulocitos y células eritroides durante quince minutos a 4°C en PBS/BSA al 0,5%/EDTA 2 mM. Tras lo anterior se llevó a cabo la adición de perlas magnéticas anti-biotina ("perlas MACS"). Las células se incubaron a 4°C durante quince minutos y después se lavaron y aplicaron a una columna LS/VS+ que había sido prelavada e insertada en el imán. La columna se lavó tres veces con tampón. Las células NK CD56+ "intactas" se encontraban contenidas en el eluado de la columna. Se confirmó la pureza mediante análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para CD56 humano y CD3 humano, ambos conjugados directamente con fluorocromos (BD Pharmingen).

**Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC):** se purificaron células NK a partir de CMSP humanas y se cultivaron durante cuarenta y ocho horas con 20 ng/ml de interleucina-2 humana recombinante (BD Pharmingen) en RPMI-1640 complementado con suero AB humano al 10% (MP Biomedical, Irvine, CA), penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptopetanol. Estas células se utilizaron como células efectoras en el ensayo citotóxico no radioactivo Cytotox 96 (Promega Corp., Madison, WI). Las células diana eran células EL-4 transfectadas con OX40 humano o parentales. Se incubaron cinco mil células diana con 0,005 a 10 µg/ml de los anticuerpos anti-OX40 humano o los anticuerpos de control durante treinta minutos sobre hielo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron veinte veces más células NK efectoras a los

pocillos en un volumen final de 100  $\mu$ l y las placas se centrifugaron a 200 x g durante tres minutos antes de incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante cuatro horas. Las placas se centrifugaron a 250 x g durante cinco minutos y se transfirieron 50  $\mu$ l de los sobrenadantes a una placa ELISA.

5 Se añadió tampón de ensayo a las placas en un volumen de 50  $\mu$ l. Tras una incubación de treinta minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50  $\mu$ l de la solución de parada a los pocillos y se determinó la absorbancia a 490 nm. Los controles requeridos fueron células diana solas (espontáneas), células diana solas tratadas con tampón de lisis durante los últimos cuarenta y cinco minutos de la incubación (máximo), células efectoras solas, pocillos que contenían medio solo con (corrección de volumen) y sin la adición del tampón de lisis. Se determinó el porcentaje de lisis específica utilizando la fórmula siguiente, tras restar el fondo del medio de todos los pocillos y restar el valor de corrección del volumen del valor máximo diana. Porcentaje de citotoxicidad=((experimental - efecto espontáneo - diana espontáneo)/(diana máximo - diana espontáneo))\*100.

10 Aislamiento de genes de anticuerpo humano anti-OX40: se recolectaron mediante centrifugación células de hibridoma en cultivo (112V8 (ATCC nº PTA-7219, depositadas el 17 de noviembre de 2005)), que producen anticuerpo 112V8 (IgG4). Se purificó el ARN total a partir de dichas 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 codifica la región variable de los genes de inmunoglobulina a partir del ARN total de las células del hibridoma. Brevemente, se preparó ADNc de primera cadena con una transcriptasa inversa a partir de dos microgramos de ARN. Este ADNc se utilizó 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 ("HV" y "LV", respectivamente). Las secuencias amplificadas contenían además las secuencias líder. La reacción fue la siguiente: 2,5 U de ADN polimerasa Ultra Pfu (Stratagene, La Jolla, CA); 0,2  $\mu$ M de cebador 3' (para la cadena pesada: IgG1p, para la cadena ligera: hk5, tabla 1); 1X mezcla A de cebador universal para el extremo 5' (cebador UMP mezcla A incluida en el kit SMART RACE); 200  $\mu$ M de mezcla de dNTP; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; tampón Ultra Pfu (concentración final: 1x) y molde de ADNc.

15 El programa de termociclado fue de cinco ciclos de: 94°C x 30 segundos, 72°C x 3 minutos. Cinco ciclos de: 94°C x 30 segundos, 70°C x 30 segundos, 72°C x 3 minutos. Veinticinco ciclos de: 94°C x 30 segundos, 68°C x 30 segundos, 72°C x 3 minutos, seguido de una extensión a 72°C x 7 minutos. Los fragmentos de ADN amplificados se recolectaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen Co., Ltd., Alemania). Los fragmentos de ADN purificados de HV y LV se integraron en el vector pCR4 Blunt-TOPO utilizando el kit de clonación mediante PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen Corp.) y cada plásmido constructo se transformó en *E. coli* y después se clonó. Se analizaron las secuencias de nucleótidos de cada inserción (HV y LV) en los plásmidos constructos utilizando cebadores específicos (M13F, M13R, tabla 1). Basándose en la secuencia obtenida de HV y LV, se diseñaron los cebadores oligonucleótidos para amplificar la VH (V8H38, V8H39) y la VL (V8L42, V8L43) (tabla 1).

20 Se clonaron VH y VL de 112V8 en el vector de expresión de IgG1. Brevemente, se diseñaron cebadores oligonucleótidos que contenían los sitios de reconocimiento de enzima de restricción 5'-Sall y 3'-Nhel con el fin de amplificar la región variable de la HV mediante PCR. Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN miniprep pTopoV8VH como molde, V8H38 y V8H39 como cebadores (tabla 1) con ADN polimerasa Ultra Pfu. Tras la digestión del producto de PCR con Nhel y Sall, se subclonó un fragmento de 410 pb en el vector de expresión de IgG1 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KG1-Val Lark (un vector modificado de N5KG1, patente US nº 6.001.358)) que se predigirió con Nhel y Sall (fragmento de ADN de 8,9 kilobases). La existencia de región variable de la HV se analizó mediante digestión de restricción.

25 Como segunda etapa se insertó LV en el vector N5KG1-Val Lark de la manera siguiente: se digirió el vector de ADN con dos enzimas de restricción de ADN: BgIII y BsiWI. Se aisló el fragmento de ADN de 9,1 kb. De manera similar al constructo de la cadena pesada, se diseño un juego de cebadores de PCR para LV que contuviese los sitios de reconocimiento para 5'BgIII y 3'BsiWI. Estos cebadores, V8L42 y V8L43, se utilizaron para amplificar VL a partir del ADN plasmídico miniprep pTopoV8VL. El producto de PCR se digirió con BgIII y BsiWI y se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa y purificación del gel. Este fragmento, que contenía V8VL, se ligó al vector de 9,1 kb preparado con ADN ligasa de T4 y se utilizó para transformar células Top10 (Invitrogen Corp.). Se seleccionaron los transformantes positivos de *E. coli*. Dicho vector de expresión, pG1K112V8, se purificó y se confirmó la presencia de ambas regiones, 112V8LV y 112V8HV, mediante análisis de restricción.

30 Se aislaron las regiones variables HV y LV 112Y55 (ATCC nº PTA-7220, depositado el 17 de noviembre de 2005), 112Y131 (ATCC nº PTA-7218, depositado el 17 de noviembre de 2005) y 112Z5 (ATCC nº PTA-7216, depositado el 17 de noviembre de 2005) y se secuenciaron utilizando el mismo protocolo. Los cebadores utilizados para la amplificación de las HV y LV específicas se listan en la tabla 1.

35 La subclase de un anticuerpo determina en parte las funciones efectoras secundarias, tales como la activación del complemento o la unión de receptor de Fc (FcR) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Huber et al., Nature 229(5284):419-20, 1971; Brunhouse et al., Mol. Immunol. 16(11):907-17, 1979). Para identificar el tipo óptimo de anticuerpo para una aplicación particular, deben considerarse las funciones efectoras de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos IgG1\_h presentan una semivida relativamente larga, resultan muy

- eficaces en la fijación del complemento y se unen tanto a FcRI como a FcRII. Por el contrario, los anticuerpos IgG4 humanos presentan una semivida más corta, no fijan el complemento y presentan una menor afinidad para FcR. La sustitución de la serina 228 por una prolina (S228P) en la región Fc de IgG4 reduce la heterogeneidad observada con IgG4\_h y extiende la semivida en suero (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5a edición, 1991; Angal et al., Mol. Immunol. 30(1):105-8, 1993). Una segunda mutación que sustituya la leucina 235 por un ácido glutámico (L235E) elimina las actividades residuales de unión a FcR y de unión al complemento (Alegre et al., J. Immunol. 148(11):3461-8, 1992). El anticuerpo resultante con ambas mutaciones se denomina IgG4PE. La numeración de los aminoácidos de IgG4\_h se derivó de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, 1991).
- Se generó un vector que expresaba IgG4PE 112V8 recombinante mediante la digestión de pG1K112V8 con NheI y BgIII para liberar el fragmento que contenía 112V8VH y 112V8VL. Lo anterior se ligó al vector de expresión IgG4PE (pN5KG4PE-Lark, IDEC Pharmaceuticals, patente US nº 6.001.358) cortado con los mismos enzimas. El plásmido resultante, pG4P3K112V8, se confirmó mediante digestión de restricción.
- Se utilizó el ARN del hibridoma 112F32 (ATCC nº PTA-7217, depositado en fecha de 17 de noviembre de 2005) para generar vectores para producir los anticuerpos recombinantes 112F32G1 y 112F32G4 de la misma manera, los cebadores 3' utilizados para la amplificación de los genes de cadena pesada y ligera en las reacción RACE eran HH-2 y HK-2, respectivamente. La amplificación de 112F32HV se llevó a cabo utilizando H725' y M2H3'. Los cebadores de amplificación 112F32LV eran F32K5' y K52D3' (tabla 1). El vector de expresión de IgG4 pN5KG4 se obtuvo de IDEC Pharmaceuticals (patente US nº 6.001.358). Los vectores resultantes, pKLG1/F32K3H y pKLG4/F32K3H se confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.
- Secuencia de nucleótidos de ADNc de 112F32HV (entre el codón de inicio (ATG) hasta el extremo de la región variable), SEC ID nº 3:
- |    |  |     |
|----|--|-----|
| 25 | ATGGAGTGGG GGCGTGCTG GGTTTCCTT GTTGTATT TAGAAGGTGT CCAGTGTGGG  | 60  |
|    | GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC  | 120 |
|    | TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA   | 180 |
|    | GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTAGTACCAT ATACTATGCA  | 240 |
|    | GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCACCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGTATCTG  | 300 |
|    | CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTATT ACTGTGCGAG AGGAGTGTAT  | 360 |
|    | CACAATGGCT GGTCCTTCTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTACTCAC CGTCTCCTCA  | 420 |
| 30 | Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112F32 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 4: |     |
|    | ATGGACATGA GGGCCTCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGTT CCCAGGTGCC  | 60  |
|    | AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAAACAGA  | 120 |
|    | GTCACCATTA CTTGTCGGGC GAGTCAGGAT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG  | 180 |
|    | AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTGCA AAGTGGGGTC   | 240 |
|    | CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTCA CTCTCACCAC CAGCAGCCTG   | 300 |
|    | CAGCCTGAAG ATTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC CCTCACCTTC   | 360 |
|    | GGCCAAGGGA CACGACTGGGA GATTAAACGA  | 390 |

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112V8 HV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 5:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCCCAG	60
ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTA GTGAAGCCCA AACAGACCT CACGCTGACC	120
TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAATGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG	180
CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA GTCATTATT GGGATGATCA TCAACTCTAC	240
AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC	300
CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACAGACGA	360
GGGGCCTTCC AGCACTGGGG CCAGGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC TTCCACCAA	419
<b>5 GGGC</b>	<b>423</b>

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112V8 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 6:

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGA	60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA	180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA	240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG	300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTAA TTACTGTCAAG CAGTATGATA GCTCGCTCAC TTTCGGCGGA	360
<b>10 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGAACT</b>	<b>387</b>

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112F32 HV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 7:

<b>MEWGPCWVFL VVILEGVQCG VQLVESGGGL VQPQGSLRLS CAASGFTSS YSMNWVRQAP</b>	60
GKGLEWVSYI SSSSSTIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRDEDT AVYYCARGVY	120
<b>HNGWSFFDYW QQGTLLTVSS</b>	<b>140</b>

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112F32 kappa LV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 8:

**MDMRVLAQLL GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SSLSASVGNR VTITCRASQD ISSWLAWYQQ** 60

KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTSSL QPEDFATYYC QQYNSYPLTF 120

GQGTRLEIKR 130

5 Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112V8 HV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 9:

**MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPLT VKPKQTLTLT CTFSGFSLST SGMGVGWIRQ** 60

PPGKALEWLA VIYWDDHQLY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCAHRR 120

GAFQHWGQGT LTVSSASTK G 141

10 Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112V8 LV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 10:

**METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK** 60

PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSLTFGG 120

GTKVEIKRT 129

15 Tabla 1: cebadores de ADN sintetizados (SEC ID nº 11 a nº 37)

Nº	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Longitud
11	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAAGGGC	22-mero
12	IgG1p	TCTTGTCACCTGGTGGCTGGGCTTGTG	31-mero
13	HK5	AGGCACACAACAGAGGCAGTCCAGATTTC	30-mero
14	M13F	GTAAAACGACGCCAGTG	18-mero
15	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-mero
16	V8H38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-mero
17	V8H39	AGAGAGAGAGGTGACCAACCATGGACACACTTGCTCCACG	41-mero
18	V8LA2	AGAGAGAGAGATCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTC	42-mero
19	V8L43	AGAGAGAGAGCGTAGCTTGTACCTCCACCTGGTCCCTCC	40-mero
20	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCGCTG	25-mero
21	HK-2	GTTGAAGCTCTTGTGACGGCGAGC	26-mero
22	F725'	ACCGTGTGACTGGATTCCAAGGCATTCCAC	32-mero
23	M2H3'	GGTGTAGCTGAGGAGACGGTGAC	24-mero
24	F32K5'	AATCAAGATCTGCAGGACACA	22-mero
25	K52D3'	TATCCCGTACGTTAACATCTCCAGTCGTGTC	30-mero
26	Y131HF	AGAGAGAGAGGTGACCAACCATGGACACACTTGCTCCACG	41-mero
27	Y131HR	AGAGAGAGA GGCTAGCTG AAGAGA CGGTGA CCATTGT	37-mero
28	Y131LF5	AGAGAGAGA GGTCGACCAACCATGG AAACCCCAG CGCAGCTT	41-mero
29	Y131LR	AGAGAGAGA GCGTACGTTGA TTT CCA CCTTGGTCCCTTG	40-mero
30	Y55HF	AGAGAGAGAGGTGACCAACCATGGACACACTTGCTCCACG	41-mero
31	Y55HR	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	37-mero
32	Y55LF	AGAGAGAGAGATCTCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTC	42-mero
33	Y55LR	AGAGAGAGAGCGTAGCTTGTACCTCCACCTGGTCCCTG	40-mero
34	Z5HF	AGA GAGAGAGGTGACCAACCATGACCATGATTACGCCAAGC	41-mero
35	Z5HR	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-mero
36	Z5LF	AGAGAGAGAGATCTCACCATGGAAAGCCCCAGCTCAGCTTC	42-mero
37	Z5LR	AGAGAGAGAGCGTAGCTTAATCTCCAGTCGTGTCCTTG	40-mero

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Y55 HV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 38:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCCCAG  
60

ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGTCC  
120

TGCACCTTCT CTGGGTTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG  
180

CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA ATGGCTTGCA CTCATTCAATT GGGATGATGC TGAGCGCTAC  
240

AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC  
300

CTTACAATGA CCAACATGGA CCTTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACACCCGG  
360

GGGGCTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA

408

5

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Y55 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 39:

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA  
60

GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGGA AAGAGGCCATC  
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAACAGAAA  
180

CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATTTA GCAGGGCAC TGGCATCCCA  
240

GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG  
300

CCTGAAGATT TTGCAGTGTAA TTACTGTCAG CAGTATGATA GCTCACGGAC GTTCGGCCAG  
360

GGGACCAAGG TGGAAATCAA A

5 381

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Y131 HV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 40:

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTTGTCCCAG  
60

ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGACC  
120

TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG  
180

CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA CTCATTTATT GGGATGATCA TAGCCCCTAC  
240

AGCCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC  
300

CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGGCCACAT ATTACTGTGC ACGCACCCGG  
360

GGGGCTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA  
408

5 Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Y131 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 41:

ATGGAAGCCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA  
60

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC  
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GGGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT  
180

ES 2 938 625 T3

GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC  
240

AGGTTCACTG GCAGTGGGCC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT  
300

GAAGATTTCAGTTTATTCTGTCACTGAGCGAG CGTAGCAACT GGCACTCCGAC GTTCGGCCAA  
360

GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAC C  
381

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Z5 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 42:

5 ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTAAC GGCGGCCAGT  
60

GTGCTGGAAT TCGCCCTTCT AATACGACTC ACTATAGGGC AAGCAGTGGT ATCAACGCAG  
120

AGTACGGGGG GAGGCTTGGT ACAGCCTGGC AGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAGCCTCT  
180

GGATTCACCC TTGATGATTATGGCATGCAC TGGTCCGGC AAGCTCCAGG GAAGGGCCTG  
240

GAGTGGGTCT CAGGTATTAG TTGGAATAGT GATAGTATAG GCTATGTGG CTCTGTGAAG  
300

GGCCGATTCA CCATCTCCAG AGACAACGCC AAGAACTCCC TGTATCTGCA AATGAACAGT  
360

CTGAGAGTTG AGGACACGGC CTTGTATTAC TGTGTAAAAG ATATTAGTGG CTGGTACAGC  
420

TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCCCTGGTC ACCGTCTCCT CA  
462

Secuencia de nucleótidos del ADNc de 112Z5 LV (entre el codón de inicio (ATG) y el final de la región variable), SEC ID nº 43:

10 ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA  
60

ES 2 938 625 T3

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC  
120

CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAACCT  
180

GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC  
240

AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT  
300

GAAGATTTG CAGTTATTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCGATCAC CTTCGGCCAA  
360

GGGACACGAC TGGAGATTAA A  
381

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Y55 HV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 44:

**MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTLS CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ**  
60

PPGKALEWLA LIHWDDAERY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDLVD TATYYCAHTR  
120

GAFDIWGQGT MVTVSS  
136

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Y55 LV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 45:

**METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERA LSCRASQSVS SSFLAWYQQK**  
60

PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSRTFGQ  
120

GTKVEIK  
127

10

# ES 2 938 625 T3

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Y131 HV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 46:

**MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTLT CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ**

60

PPGKALEWLA LIYWDDHSPY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCARTR

120

GAFDIWGQQGT MVTVSS

136

5

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Y131 LV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 47:

**MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVS SYLAWYQQKP**

60

GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGPGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPTFGQ

120

GTKVEIK

127

10

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Z5 HV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 48:

**MTMITPSLVP SSDPLVTAAS VLEFALLIRL TIGQAVVSTQ STGGGLVQPG RSLRLSCAAS**

60

GFTLDDYGMH WVRQAPGKGL EWVSGISWNS DSIGYVDSVK GRTTISRDNA KNSLYLQMNS

120

LRVEDTALYY CVKDISHWYS FDYWGQQTLV TVSS

154

Secuencia de aminoácidos del ADNc de 112Z5 LV (secuencia líder (en negrita) y región variable), SEC ID nº 49:

**MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP**

60

GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ

120

GTRLEIK

127

- 5 Producción de anticuerpo humano anti-OX40 recombinante a partir de células CHO:

Para la producción de anticuerpo recombinante, los vectores de anticuerpo individuales que contenían el anticuerpo anti-OX40 se electroporaron en la cepa defectiva para dhfr de célula hospedadora de célula de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC nº CRL-9096) y se aisló el anticuerpo recombinante del sobrenadante de las células transfectadas. Brevemente, se linearizaron diez microgramos del vector de expresión de ADN purificado mediante un enzima de restricción del ADN, NruI, y el ADN se transfeció en  $3 \times 10^6$  células CHO utilizando un electroporador Bio Rad (0,8 kV, 25  $\mu$ F). Las células transfectadas se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos, en medio libre de suero para CHO EX-CELL 325 PF con glutamina (JRH Bioscience, Lenexa, KS) complementado con penicilina/estreptomicina (BioWhitaker), HT (Sigma) y geneticina (Invitrogen Corp.) para seleccionar las células CHO que contenían el vector de ADN. Tras la selección de varias líneas de transfectante estables, se identificaron mediante ELISA productores de un nivel elevado de IgG humana y se utilizaron para la producción de anticuerpo recombinante.

#### Ejemplo 2

20 El ejemplo describe diversas características de los anticuerpos monoclonales humanos contra OX40 humano.

Se inmunizaron ratones KM mice<sup>TM</sup> con OX40\_h:Fc\_h recombinante soluble en CIFA/IFA, conjugado de OX40\_h:Fc\_h+OX40\_h:Fc\_h+ova en RIBI, OX40\_h:Fc\_h desnaturizado por calor en RIBI, o células T humanas activadas irradiadas en RIBI. Varios ratones indujeron anticuerpos específicos anti-OX40 humano, con un abanico de títulos específicos de IgG humana de OX40. Los esplenocitos de los respondedores más altos se fusionaron con células de mieloma para generar hibridomas productores de anticuerpos humanos anti-OX40 humano. La producción de anticuerpos anti-OX40 se determinó tanto mediante ELISA como citometría de flujo utilizando transfectantes recombinantes de OX40\_h:Fc soluble y CHO-OX40, respectivamente. Se clonaron los hibridomas positivos mediante dilución limitante, rindiendo hibridomas monoclonales (tabla 2).

Tabla 2: antígenos utilizados para la generación de anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno
112F32	OX40_h:Fc_h
112V8	Células T humanas activadas
112Y55	OX40_h:Fc_h más OX40_h:Fc_h-ovoalbúmina
112Y131	OX40_h:Fc_h más OX40_h:Fc_h-ovoalbúmina
112Z5	OX40_h:Fc_h desnaturizado por calor

35 Se caracterizaron adicionalmente varios anticuerpos para la afinidad de unión relativa para OX40 humana, la capacidad de bloquear la unión de ligando de OX40 humano in vitro, el bloqueo cruzado entre sí, el bloqueo de la proliferación in vitro, la capacidad de bloquear la inflamación in vivo y la capacidad de mediar en la ADCC (tabla 3).

40 La totalidad de 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 y 112Z5 se unió específicamente a las células T humanas activadas, pero no a las células T humanas en reposo (figura 1). Las células T humanas activadas durante tres días se marcaron con anticuerpo humano anti-OX40 humano a diversas concentraciones y se detectaron con anti-IgG humana-PE. La unión de estos anticuerpos humanos anti-OX40 humano era saturable. La unión máxima de cada anticuerpo se determinó titulando la cantidad de anticuerpo necesaria para marcar las células T humanas activadas (figura 2). Se obtuvo un abanico de afinidades de unión relativas (KD y BMAX, tabla 3). La unión del anticuerpo de ratón anti-OX40 humano purificado L106 también se determinó y la totalidad de 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5 presentaba una BMAX más alta que L106 sobre las células T activadas.

Tabla 3: características de los anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40 humano

Anticuerpo	Subclase original	Epítopo	Marcaje de células T activadas		Bloqueo de OX40L mediante ELISA, IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Bloqueo de OX40L mediante FACS sobre las células T, IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Eficacia in vitro	Eficacia in vivo	ADCC (% de lisis a 10 μg/ml)
			K <sub>D</sub> (μM)	BMAX media geom.					
112F32	IgG4	A	0,013	103,5	0,650	ni*	+^	IgG1 +^ IgG4 +	IgG1 37% IgG4 NT
112V8	IgG4	B	0,036	180,8	0,051	0,62	+	IgG1 + IgG4 +	IgG1 55,6% IgG4 18%
112Y55	IgG1	B	0,014	161,8	0,073	0,90	+	+	54,2%
112Y131	IgG4	B	0,025	170,7	0,069	0,91	+	+	18%
112Z5	IgG1	C	0,011	118,2	0,081	14,65	+	+	35%
L106	IgG1 de ratón	L	0,001	52,0	0,982	60,91	NT	NT	NT

\*: ni, no inhibidor a 50 μg/ml

5 ^: +: proliferación inhibida in vitro o enfermedad in vivo, no cuantitativa

#: NA, no analizado

@: porcentaje de lisis con anticuerpo irrelevante a 10 μg/ml era de 14%

10 Se analizaron los anticuerpos de OX40 mediante ELISA para determinar si competían con otro para la unión a OX40 soluble. Los anticuerpos humanos individuales se utilizaron para recubrir los pocillos de una placa de 96 pocillos. Se preincubó OX40\_h:Fc\_m con anticuerpos anti-OX40 solubles (anticuerpos bloqueantes) y después se añadieron a los pocillos recubiertos. La unión de OX40\_h:Fc\_m al anticuerpo recubierto se detectó con anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula siguiente: (100-(DO muestra/DO muestra de unión máxima)) \* 100 (figura 3A).

15 Además, se utilizaron anticuerpos de ratón para recubrir los pocillos de una placa de 96 pocillos (L106, 315, ACT35 o IgG de ratón) y se preincubó OX40\_h:Fc\_h con los anticuerpos bloqueantes. La unión de OX40\_h:Fc\_h se detectó con anticuerpo de oveja anti-IgG humana-HRP (figura 3B).

20 Se identificaron tres grupos de "epítopenos" para dichos anticuerpos anti-OX40 humano. La totalidad de 112V8, 112Y55 y 112Y131 se bloquearon cruzadamente, mientras que cada uno de 112F32 y 112Z5 presentaba sitios de unión únicos. 112V8, 112Y131 y 112Y55 redujeron parcialmente la unión de 112Z5 pero no el inverso no era cierto; 112Z5 sólo se bloqueaba a sí mismo. Lo anterior sugiere que 112Z5 reconoce un epítopo diferente que 112V8, 112Y55 y 112Y131 y cualquier reducción de la unión puede deberse a impedimentos estéricos. Estos anticuerpos humanos anti-OX40 no bloquean la unión de L106, 315 o ACT35 a OX40 (figuras 3A y 3B), mientras que L106 se bloquea a sí mismo y ACT35 sólo redujo la unión de 112V8 y 112Y131 en 10% en comparación con anticuerpos de control (línea continua) que no se unen a OX40. Lo anterior indica que los anticuerpos indicados en la presente memoria reconocen un epítopo diferente que L106. El clon 315 no redujo la unión de 112V8 y 112Y131; sin embargo, debido a que estos últimos anticuerpos no bloqueaban la unión de 315, deben de unirse a epítopos diferentes.

30 También se utilizó un ensayo de citometría de flujo para evaluar la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión a OX40 expresado en superficie sobre las células T humanas activadas. Se tiñeron las células T activadas con los anticuerpos bloqueantes, seguido de la adición de anticuerpos anti-OX40 biotinilados. Además, se marcaron células T humanas activadas con anticuerpos de ratón anti-OX40 humano para bloquear la unión de OX40. La unión de los anticuerpos anti-OX40 biotinilados a dichas células se detectó con SA-PE. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. La media geométrica de la tinción de SA-PE positiva se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición utilizando la misma fórmula, es decir: (100-(DO muestra/DO muestra de unión máxima))\*100. Estos datos (figuras 4A y 4B) se correlacionan con el análisis de ELISA.

40 Tres epítopenos son reconocidos por los anticuerpos humanos anti-OX40 humano, uno por 112F32, un segundo por 112Z5, y un tercero por 112V8 y 112Y131. Al igual que con los datos de ELISA, 112Z5 sólo se bloqueó a sí mismo, pero su unión resultó reducida por 112V8 y 112Y131. Lo mismo es cierto para el bloqueo por L106 de 112V8 y 112Y131. En el caso de que L106 se encuentre unido en primer lugar a las células, 112V8 y 112Y131 todavía pueden unirse eficientemente a OX40 humano. Sin embargo, 112V8 y 112Y131 inhibieron la unión de L106. Estos

datos conjuntamente sugieren que los anticuerpos impiden estéricamente la unión de L106, pero no reconocen el mismo epítopo. 112F32 y 112Z5 no bloquean la unión de L106. ACT35 no inhibió la unión de 112F32, 112V8, 112Y131 o 112Z5, pero el clon 315 sí redujo la unión de 112V8 y 112Y131 en un 50%. La unión y detección de anticuerpos a células vivas puede inducir la internalización de la molécula superficial de manera que el nivel de unión de un anticuerpo individual puede reducirse debido a la expresión superficial más baja global de OX40 y no al bloqueo de la unión de los anticuerpos. Los anticuerpos de afinidad más alta pueden provocar más internalización que los anticuerpos de afinidad más baja. Lo anterior podría explicar las diferencias entre los datos de ELISA y de la citometría de flujo, así como la diferencia en los resultados dependiente de qué anticuerpo se utiliza para el bloqueo.

La capacidad de 112F32, 112V8, 112Y131, 112Y55 y 112Z5 de bloquear la unión de OX40L\_h soluble a la proteína de fusión OX40\_h:Fc\_h se sometió a ensayo utilizando un protocolo de ELISA (figura 5A, tabla 3). Las placas se recubrieron con OX40\_h:Fc\_h y tras el bloqueo de sitios no específicos, se dejó que se uniesen los anticuerpos anti-OX40. Sin lavado se añadió OX40L-FLAG a los pocillos. Se detectó el ligando unido con anticuerpo secundario anti-FLAG-HRP. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula siguiente: (100-(DO muestra/DO máxima unión de OX40L))\*100. Tanto 112V8, como 112Y55 y 112Y131 impidieron el 85% de la unión de OX40L soluble a OX40\_h:Fc\_h. 112F32 impidió aproximadamente 70% de la unión de OX40L\_h soluble a OX40\_h:Fc\_h y 112Z5 bloqueó el 67% de la unión máxima. Estos datos sugieren que estos anticuerpos humanos anti-OX40 humano se unen a la parte de OX40 que participa en la unión de ligando.

Se obtuvieron resultados ligeramente diferentes al utilizar un ensayo basado en la citometría de flujo para monitorizar el bloqueo de la unión de OX40L soluble a células T humanas activadas que expresaban OX40 (figura 5B). Las células T humanas activadas se marcaron con anticuerpos anti-OX40 seguido de OX40L humano etiquetado con Flag soluble. Se detectó la unión de OX40L con el anticuerpo anti-FLAG-PE. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando la misma fórmula, es decir, (100-(muestra/unión máxima))\*100. En el presente estudio, 112F32 no pudo impedir la unión de OX40L y se redujo el bloqueo por 112Z5, mientras que los otros anticuerpos, 112V8, 112Y55 y 112Y131 continuaron presentaron capacidades de bloqueo similares. La diferencia en los resultados podría depender de la afinidad de 112F32 y 112Z5 para OX40. También podría deberse a la trimerización de la proteína OX40 sobre la superficie celular, a diferencia de la dimerización de la proteína de fusión soluble OX40:Fc\_m.

Alternativamente, OX40 expresado sobre la superficie de las células T activadas podría encontrarse en un complejo con 4-1BB (Ma et al., Blood 106(6):2002-10, 2005) o una molécula inhibidora similar a BTLA (Cheung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(37):13218-23, 2005; Compaan et al., J. Biol. Chem. 280(47):39533-6, 2005; Croft, Trends Immunol. 26(6):292-4, 2005; González et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(4):1116-21, 2005; Sedy et al., Nat. Immunol. 6(1):90-8, 2005) que impide la unión de 112F32 o reduce la unión de 112Z5 pero no bloquea la unión de OX40L a OX40. Las tres últimas posibilidades podrían apuntar al epítopo específico al que se unen los anticuerpos individuales. El epítopo reconocido por L106, un anticuerpo de ratón anti-OX40 humano, también depende de la confirmación del ligando de OX40 y OX40, ya que L106 bloqueó el 95% de la unión de OX40L a la proteína OX40 recombinante, pero sólo el 60% de la unión a las células T activadas. Estos datos indican que existen múltiples epítopos sobre OX40, algunos de los cuales interfieren por completo con la unión de OX40L, mientras que otros sólo bloquean parcialmente la interacción. La unión de dichos anticuerpos a los diferentes epítopos podría presentar o no consecuencias funcionales únicas.

El bloqueo de la unión de ligando mediante cualquiera de los procedimientos no implica necesariamente que la señalización de OX40 resulte alterada negativamente por un anticuerpo dado. Para determinar si los anticuerpos humanos anti-OX40 humano pueden bloquear la señalización a través de OX40, se prepararon cultivos de linfocitos mezclados por pares utilizando CMSP totales procedentes de donantes alogénicos. Las células mononucleares de sangre periférica de donantes alogénicos se cocultivaron en placas de fondo en U de 96 pocillos durante siete días en presencia o en ausencia de diversas dosis de anticuerpos anti-OX40 o anticuerpo de control por triplicado. Se añadieron a cada pocillo  $1 \times 10^5$  células/donante. Las placas se pulsaron durante las últimas dieciocho horas de cultivo con  $1 \mu\text{Ci}/\text{pocillo}$  de  $^3\text{HTdR}$ . Se recolectaron las células y se contaron en un contador de centelleo. Se midió la proliferación en presencia o en ausencia de anticuerpos de control o anti-OX40 (figura 6). La totalidad de 112V8 (figura 6A), 112Y55 y 112Z5 (figura 6B) y 112Y55, 112Y131 y 112F32 (figura 6C) fueron capaces de reducir la cantidad de proliferación inducida por las células alogénicas de una manera dependiente de la dosis, mientras que una IgG4\_h de control negativo, anti-albúmina de suero humano, no presentó ningún efecto sobre la proliferación (figura 6A). Se llevaron a cabo múltiples estudios y la magnitud de las respuestas, CPM máximas incorporadas, era dependiente de la combinación de CMSP donantes utilizadas para cada ensayo. En cultivos de linfocitos mixtos, tanto las células T CD4 como CD8 respondieron a los antígenos alogénicos. La reducción de la respuesta proliferativa por los anticuerpos humanos anti-OX40 humanos podría deberse a la inhibición directa de tanto las células T CD4 como CD8.

### Ejemplo 3

El presente ejemplo describe el mapeado de epítopos de anticuerpos humanos anti-OX40 humano con péptidos lineales de OX40 humano.

Se seleccionaron tres péptidos dentro del dominio extracelular de la OX40 humana (tabla 4) para iniciar el mapeado del epítopo o epítopos reconocidos por 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5.

5

Tabla 4: péptidos OX40 humanos

Nombre de péptido	Sec. de péptido	Anticuerpo				
		112F32	112V8	112Y55	112Y131	112Z5
112A	RPAGPGFYNDVVSSKPC	-	-	-	-	-
112B	RAGTQPLDSYKPGVDC	-	-	-	-	-
112C	LAGKHTLQPASNSSDAIC	-	-	-	-	-

Los péptidos se generaron mediante A y A Lab, LLC y se conjugaron con hemocianina de lapa americana ("KLH") con un conector maleimida siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce). Los péptidos se utilizaron para el recubrimiento a una concentración de 10 µg/ml en tampón de carbonato a placas de ELISA Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) a 4°C durante la noche. La placa se lavó con PBS/Tween-20 al 0,1% y después se bloqueó con tampón de caseína (Pierce) durante tres horas a temperatura ambiente. Se añadieron anticuerpos candidatos a una concentración de 10 µg/ml diluidos en caseína al 10% en PBS/Tween-20 al 0,1%. El resto del ELISA se llevó a cabo tal como se ha indicado para el ELISA de detección de anticuerpo específico de OX40.

Ninguno de los anticuerpos humanos anti-OX40 humano reaccionen detectablemente con dichos péptidos OX40 humanos, mientras que el suero de ratones inmunizados con los péptidos se unió al péptido apropiado. Estos resultados indican que 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5 no se unen detectablemente a dichos epítopos lineales cortos de la secuencia extracelular de OX40 humano bajo las condiciones de ensayo utilizadas. Estos datos no impiden que dichas secuencias sean reconocidas por los anticuerpos humanos anti-OX40 humano en caso de incluirse en secuencias peptídicas más largas.

#### Ejemplo 4

El presente ejemplo describe el análisis funcional *in vivo* de anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40 humano

Se utilizó un modelo de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) xenogénico agudo para someter a ensayo el potencial terapéutico del anticuerpo humano anti-OX40 humano 112V8G1 *in vivo* (Watanabe et al., Clin. Immunol. 120:247-259, 2006). En este modelo, se transfirieron células mononucleares de sangre periférica humana a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Antes de la transferencia, los ratones fueron tratados con un anticuerpo anti-cadena IL2Rβ para reducir el número de células asesinas naturales murinas endógenas y después se irradiaron subletalmente para permitir la migración de las células humanas al tracto intestinal. Las células T humanas se expanden e inducen una enfermedad de tipo injerto contra el huésped, resultando en la 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 las células T purificadas induce síntomas similares.

Los ratones SCID se trataron tal como se ha indicado anteriormente más anticuerpos recombinantes 112V8G1 o IgG1 humana de isotipo de control (anti-DNP) administrados el día 0 para someter a ensayo el potencial profiláctico del bloqueo de OX40. Los ratones recibieron 100, 20 o 2 µg de anticuerpo 112V8G1 o 100 µg de anti-DNP mediante inyección intravenosa el día 0. Se determinó el peso corporal cada tres a cuatro días. El día doce, los ratones se sacrificaron y se analizaron para síntomas de enfermedad y se recolectaron los bazo para el análisis de citometría de flujo. La patología macroscópica observada el día doce se puntuó de la manera siguiente: diarrea (0-1), hemorragias en el intestino y en la cavidad peritoneal y peritonitis (cada uno, 0-5), indicando el número más alto, más gravedad de la enfermedad. Se utilizó la suma de todos los síntomas de enfermedad para determinar la puntuación total de patología macroscópica. Todos los ratones que habían recibido el anticuerpo de control mostraron síntomas de la EICH, con puntuaciones patológicas más altas que los ratones que habían recibido 112V8G1. Todas las dosis de 112V8G1 sometidas a ensayo redujeron o evitaron dichos síntomas (figura 7A).

Los análisis de los bazo concordaron con dicha observación. Se analizaron las suspensiones de células individuales mediante citometría de flujo para la presencia de células T humanas. Las células T humanas se encontraban presentes en los bazo de los ratones tratados con los anticuerpos de control, pero el número de células T humanas en los animales tratados con 112V8G1 eran significativamente más bajos que el número de células T en los animales de control (figura 7B). Además, se midieron las citocinas humanas inflamatorias (interferón-gamma, factor de necrosis tumoral y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) en el suero utilizando tecnología multiplex. Las citocinas humanas inflamatorias se redujeron en los animales tratados con 112V8G1 en comparación con los controles. El efecto más drástico se observó en los niveles de interferón gamma (figura 7C). La aparición de las células T OX40+ en la sangre periférica de los pacientes de trasplante de médula ósea alogénica se ha correlacionado con la aparición de EICH crónica (Gadisseur et al., Bone Marrow

Transplant 23(10):1013-7, 1999; Kotani et al., Blood 98(10):3162-4, 2001; Sánchez et al., Br. J. Haematol. 126(5):697-703, 2004).

- 5 Con el fin de evaluar la eficacia del bloqueo de OX40 en el tratamiento de la EICH crónica, se estableció un sistema modelo animal de EICH xenogénica crónica. El modelo era similar al modelo de EICH xenogénica aguda, excepto en que se injectó un millón de células CD4+ purificadas en los ratones SCID en lugar de CMSP totales. También se redujo la dosis de irradiación a 2,12Gy para reducir el nivel de daño intestinal. La primera prueba de enfermedad es la pérdida de peso y la pérdida de peso, seguido de la muerte, que se debe en parte a la infiltración de células T en los pulmones. Los síntomas de la enfermedad resultan evidentes en torno al día treinta. Se trató cada grupo de cinco ratones con anticuerpo recombinante 112V8G1 a dosis de 100, 20 o 2 µg semanalmente durante cinco semanas o con anticuerpo de control IgG1\_h anti-DNP a una dosis de 100 µg semanalmente durante cinco semanas. Los ratones supervivientes se analizaron en la semana siete. Se determinaron las puntuaciones de patología macroscópica a partir del grado de pérdida de pelo, hemorragias y peritonitis (cada uno, 0-5) y diarrea (0-1).
- 10 15 La patología macroscópica primaria observada fue pérdida de peso y las tres dosis de 112V8G1 redujeron dicho síntoma de enfermedad en comparación con los ratones tratados con control (figura 8A). Esta observación concuerda con la reducción de las células T humanas en los bazo de ratones tratados con 112V8G1 el día 48 después de la transferencia de células T CD4 (figura 8B). En este modelo, las células T humanas migran a los nódulos linfáticos, los cuales se detectan fácilmente en los animales de control, pero están significativamente reducidos o no se encuentran en los animales tratados con anti-OX40 (figura 8C). Observación: no se observaron nódulos linfáticos en los animales tratados con 112V8G1, ni a 20 ni a 100 µg.
- 20 25 Además, al contrario que el modelo agudo, las células positivas para OX40 pueden detectarse fácilmente en los bazo y nódulos linfáticos de los ratones tratados con control y se redujo el número de células OX40+ en los animales tratados con 112V8G1 (figuras 8B y 8C). Se detectaron citocinas inflamatorias en el suero de los ratones que habían recibido células T CD4 humanas y se redujo la cantidad de citocinas detectadas en los ratones tratados con anticuerpo anti-OX40 humano 112V8G1 en comparación con IgG1 humana de control. Entre las citocinas producidas en este modelo de enfermedad se incluyen, aunque sin limitación, interleucina-2, interleucina-4, 30 interleucina-6, interleucina-8, interleucina-10, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, interferón-gamma y factor alfa de necrosis tumoral. Todas las citocinas excepto la interleucina 6 se redujeron significativamente mediante el tratamiento con 112V8G1, demostrando la actividad antiinflamatoria de la inhibición de la señalización de OX40 mediante reducción del número y/o el bloqueo.
- 35 40 45 50 55 60 65 Se estudió 112V8G4PE en el modelo de EICH aguda utilizando un régimen profiláctico. Este anticuerpo no presenta actividad de reducción debido a su incapacidad para fijar el complemento o para unirse a receptores de Fc y, por lo tanto, la prevención de la enfermedad dependería del bloqueo de la señalización de OX40 o de la modulación negativa de OX40. Se administró una única inyección de 112V8G4P3 a una dosis de 200, 20 o 2 µg el día 0 en cinco ratones por grupo. Los ratones tratados con control recibieron 200 µg de anticuerpo humano IgG4 anti-DNP el día 0, 3 o 6. Se analizaron los ratones el día doce para patología macroscópica y el número de células T humanas en los bazo (figuras 9A y 9B, tabla 5). Se puntuó la patología macroscópica el día doce en una escala de 0 a 3 para diarrea, hemorragias peritoneales o ascites, y hemorragias intestinales, siendo 0 la no observación de patología y representando 3 una enfermedad grave. Tanto 200 como 20 µg de 112V8G4PE evitaron el desarrollo de patología evidente, mientras que la dosis de 2 µg no resultó suficiente para evitar la enfermedad. La magnitud de la patología macroscópica se correlacionó con el número de células T humanas en el bazo el día doce. En comparación con los animales tratados con control, 200 o 20 µg de 112V8G4PE redujeron significativamente la acumulación de células T humanas en el bazo, mientras que una dosis de 2 µg resultó ineficaz. Las diferencias observadas en las titulaciones de 112V8G4PE (figuras 9A y 9B) y 112V8G1 (figura 7) se atribuyeron a la falta de actividad de reducción del nivel de anticuerpo 112V8G4PE.
- Se retrasó la administración de 112V8G4PE hasta el día tres o el día seis para someter a ensayo la eficacia terapéutica del bloqueo de la señalización de OX40. Los ratones fueron tratados con 200 µg de 112V8G4PE o anticuerpo IgG4 humano de control el día tres o el día seis después de la transferencia de CMSP humanas. Se evaluó la patología macroscópica el día catorce. El bloqueo de la señalización de OX40 mejoró la enfermedad al administrar el anticuerpo 112V8G4PE anti-OX40 humano el día tres o el día seis en comparación con el nivel de la enfermedad observado en los animales tratados con anticuerpo de control (figura 9C). El número de células T humanas en los bazo de los ratones tratados con anti-OX40 también se redujo significativamente en comparación con los ratones tratados con control. El anticuerpo 112V8G1 también redujo la enfermedad al administrarlo el día seis. Estos datos demuestran la eficacia del bloqueo de OX40 por anticuerpos específicos de OX40 como enfoque terapéutico a la reducción de la patología de la enfermedad.
- En modelos xenogénicos tanto agudos como crónicos de enfermedad del injerto contra el huésped, el anticuerpo 112V8, un anticuerpo humano anti-OX40 humano, redujo significativamente la patología macroscópica, la producción de citocinas inflamatorias y el número de células T humanas en los bazo y nódulos linfáticos en comparación con los animales tratados con control. Estos datos demuestran que el tratamiento dirigido directamente a células positivas para OX40 es una terapia adecuada para la prevención (profilaxis) y la mejora

(terapéutica) de las enfermedades mediadas por células T. Se obtuvieron resultados similares en uno o ambos modelos con 112F32, 112Y55, 112Y131 y 112Z5 (tabla 3).

En el modelo de EICH aguda, resultan necesarias las células T humanas tanto CD4 como CD8 para la enfermedad. las células T CD4 resultan necesarias para la inducción, mientras que las células T CD8 median en la mayor parte de la patogénesis. La prevención y mejora de la enfermedad mediante la administración de uno de los anticuerpos humanos anti-OX40 humano descritos podría deberse al antagonismo directo de las células T tanto CD4 como CD8, o podría deberse al bloqueo directo de las células T CD4 con un efecto indirecto sobre las células T CD8 mediante la reducción de la ayuda de CD4. Además, los anticuerpos de OX40 podrían estimular la generación o incrementar el número de células T reguladoras. Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, sería posible que uno o todos los mecanismos indicados mediaran en la mejora de la enfermedad.

Aunque sin deseo de limitarse a ninguna teoría en particular, un mecanismo potencial de acción de dichos anticuerpos anti-OX40 humano podría ser la inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por células asesinas naturales o células neutrófilas efectoras. Este proceso es dependiente de la capacidad de los receptores de Fc expresados por las células efectoras de unirse a los anticuerpos anti-OX40 unidos a OX40 expresado sobre las células T activadas. La capacidad de las inmunoglobulinas de unirse a los receptores de Fc está determinada por la subclase del anticuerpo y por el tipo de receptor de Fc. Los anticuerpos IgG1 humanos se unen a receptores de Fc sobre las células asesinas naturales y los neutrófilos, mientras que los anticuerpos IgG4 humanos no lo hacen (Huber et al., *Nature* 229(5284):419-420, 1971; Brunhouse et al., *Mol. Immunol.* 16(11):907-17, 1979). Los anticuerpos humanos anti-OX40 humano 112F32 (IgG1), 112V8 (IgG1 e IgG4PE), 112Y55 (IgG1), 112Y131 (IgG4) y 112Z5 (IgG1) se sometieron a ensayo para su capacidad de mediar en la ADCC de las células diana expresantes de OX40 por parte de células asesinas naturales humanas.

Se utilizó un ensayo de citotoxicidad no radioactivo para determinar el porcentaje de lisis específica de las células diana tras una incubación de cuatro horas con los anticuerpos humanos anti-OX40 humano y células asesinas naturales humanas en una proporción de veinte células efectoras por cada célula diana (figura 10). Las células diana EL4-OX40 humano se marcaron con 0,001 a 10 µg/ml de anticuerpos anti-OX40 o de control negativo y después se incubaron con células asesinas naturales humanas. Se determinó la lisis de las células diana a partir de la liberación de lactosa deshidrogenasa en un ensayo de citotoxicidad no radioactivo. Se determinó el porcentaje de lisis específica tal como se indica en los procedimientos. Los anticuerpos IgG1 humanos anti-OX40 humano indujeron ADCC de las células diana EL4-OX40 humano de una manera dependiente de la dosis. Los anticuerpos IgG4 humanos anti-OX40 y un anticuerpo IgG1 humano de control no indujeron lisis específica de las células diana. El nivel de actividad de ADCC se correlaciona con la afinidad de unión relativa y el grupo de epítopo, ya que aquellos anticuerpos en el grupo de epítipo B (112V8 y 112Y55) mostraron ambos una actividad de ADCC más alta que los anticuerpos en los grupos A (112F32) y C (112Z5).

Los resultados de los análisis descritos en la presente memoria identifican anticuerpos con un abanico de afinidades de unión, tres epítopos diferentes y la demostración de su eficacia en el bloqueo de la unión del ligando de OX40 y la prevención o mejora de las reacciones inflamatorias mediadas por las células T. La capacidad de dichos anticuerpos humanos anti-OX40 humano (112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131 y 112Z5) de reducir la proliferación, progresión de la enfermedad y producción de citocinas inflamatorias demuestra el potencial del bloqueo directo de OX40 como enfoque para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias mediadas por las células T, incluyendo, aunque sin limitación, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la soriasis, la enfermedad de Crohn, la enfermedad del injerto contra el huésped y el rechazo del trasplante. La reducción de la actividad de los anticuerpos anti-OX40 no resulta necesaria para la reducción de la proliferación o la mejora de enfermedades, reduciendo los potenciales efectos adversos debidos a la reducción del número de células T.

## 50 Bibliografía

- Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." *J Exp Med* 191(2): 375-80.
- Al-Shamkhani, A., S. Mallett, et al. (1997). "Affinity and kinetics of the interaction between soluble trimeric OX40 ligand, a member of the tumor necrosis factor superfamily, and its receptor OX40 on activated T cells." *J Biol Chem* 272(8): 5275-82.
- Alegre, M. L., A. M. Collins, et al. (1992). "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody." *J Immunol* 148(11): 3461-8.
- Angal, S., D. J. King, et al. (1993). "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody." *Mol Immunol* 30(1): 105-8.
- Bachmann, M. F., M. Barner, et al. (1999). "CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation." *J Exp Med* 190(10): 1383-92.

- Bansal-Pakala, P., A. G. Jember, et al. (2001). "Signaling through OX40 (CD 134) breaks peripheral T-cell tolerance." *Nat Med* 7(8): 907-12.
- 5 Baum, P. R., R. B. Gayle; 3rd, et al. (1994). "Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34." *Embo J* 13(17): 3992-4001.
- 10 Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Identification of OX40 ligand and preliminary characterization of its activities on OX40 receptor." *Circ Shock* 44(1): 30-4.
- Blazar, B. R., A. H. Sharpe, et al. (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow-transplant recipients." *Blood* 101(9): 3741-8.
- 15 Brocker, T., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles." *Eur J Immunol* 29(5): 1610-6.
- 20 Brugnoni, D., A. Bettinardi, et al. (1998). "CD134/OX40 expression by synovial fluid CD4+ T lymphocytes in chronic synovitis." *Br J Rheumatol* 37(5): 584-5.
- Brunhouse, R. and J. J. Cebra (1979). "Isotypes of IgG: comparison of the primary structures of three pairs of isotypes which differ in their ability to activate compliment" *Mol Immunol* 16(11): 907-17.
- 25 Calderhead, D. M., J. E. Buhlmann, et al. (1993). "Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions." *J Immunol* 151(10): 5261-71.
- 30 Cheung, T. C., I. R. Humphreys, et al. (2005). "Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway." *Proc Natl Acad Sci USA* 102(37): 13218-23.
- Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, et al. (2005). "Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the btl-a-hvem complex." *J Biol Chem*.
- 35 Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4): 265-73.
- Croft, M. (2005). "The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA." *Trends Immunol* 26(6): 292-4.
- 40 Evans, D. E., R. A. Prell, et al. (2001). "Engagement of OX40 enhances antigen-specific CD4(+) T cell mobilization/memory development and humoral immunity: comparison of alphaOX-40 with alphaCTLA-4." *J Immunol* 167(12): 6804-11.
- Gadisseur, A. P., J. W. Gratama, et al. (1999). "Expression of T cell activation antigen CD134 (OX40) has no predictive value for the occurrence or response to therapy of acute graft-versus-host disease in partial T cell-depleted bone marrow transplantation." *Bone Marrow Transplant* 23(10): 1013-7.
- 45 Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(4): 1116-21.
- Gramaglia, I., A. Jember, et al. (2000). "The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion." *J Immunol* 165(6): 3043-50.
- 50 Gramaglia, I., A. D. Weinberg, et al. (1998). "Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." *J Immunol* 161(12): 6510-7.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." *Annu Rev Immunol* 16: 111-35.
- 55 Higgins, L. M., S. A. McDonald, et al. (1999). "Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein." *J Immune* 162(1): 486-93.
- 60 Huber, H., S. D. Douglas, et al. (1971). "IgG subclass specificity or human monocyte receptor sites." *Nature* 229(5284): 419-20.

- Humphreys, I. R., G. Walzl, et al. (2003). "A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection." *J Exp Med* 198(8): 1237-42.
- 5 Imura, A., T. Hori, et al. (1996). "The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells." *J Exp Med* 183(5): 2185-95.
- 10 Imura, A., T. Hori, et al. (1997). "OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration." *Blood* 89(8): 2951-8.
- Ishida and Lonberg (2000). 11th Antibody Engineering Meeting.
- 15 Kabat, e. a. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*. Fifth Edition.
- Kaleeba, J. A., H. Offner, et al. (1998). "The OX-40 receptor provides a potent co-stimulatory signal capable of inducing encephalitogenicity in myelin-specific CD4+ T cells." *Int Immunol* 10(4): 453-61.
- 20 Kjaergaard, J., J. Tanaka, et al. (2000). "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." *Cancer Res* 60(19): 5514-21.
- Kotani, A., T. Ishikawa, et al. (2001). "Correlation of peripheral blood OX40+(CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* 98(10): 3162-4.
- 25 Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2002). "Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin." *Nat Biotechnol* 20(9): 889-94.
- 30 Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2004). "Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle." *Nat Genet* 36(7): 775-80.
- Lane, P. (2000). "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells." *J Exp Med* 191(2):
- 35 Latza, U., H. Durkop, et al. (1994). "The human OX40 homology cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen." *Eur J Immunol* 24(3): 677-83.
- Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." *J Exp Med* 173(3): 721-30.
- 40 Linton, P. J., B. Bautista, et al. (2003). "Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo." *J Exp Med* 197(7): 875-83.
- 45 Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.
- Lonberg, N. and D. Huszar (1995). "Human antibodies from transgenic mice." *Int Rev Immunol* 13(1): 65-93.
- 50 Ma, B. Y., S. A. Mikolajczak, et al. (2005). "The expression and the regulatory role of OX40 and 4-iBB heterodimer in activated human T cells." *Blood* 106(6): 2002-10.
- Mallett, S., S. Possum, et al. (1990). "Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor." *Embo J* 9(4): 1063-8.
- 55 Maxwell, J. R., C. Ruby, et al. (2002). "Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity." *J Immunol* 168(9): 4372-81.
- Maxwell, J. R., A. Weinberg, et al. (2000). "Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion." *J Immunol* 164(1): 107-12.
- 60 Pakala, S. V., P. Bansal-Pakala, et al. (2004). "Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions." *Eur J Immunol* 34(11): 3039-46.
- 65 Paterson, D. J., W. A. Jefferies, et al. (1987). "Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts." *Mol Immunol* 24(12): 1281-90.

- Rogers, P. R. and M. Croft (2000). "CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." *J Immunol* 164(6): 2955-63.
- 5 Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* 15(3): 445-55.
- Salek-Ardakani, S. and M. Croft (2005). "Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134)." *Vaccine*.
- 10 Sanchez, J., J. Casano, et al. (2004). "Kinetic of regulatory CD25high and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *Br J Haematol* 126(5): 697-703.
- Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." *Nat Immunol* 6(1): 90-8.
- 15 Seko, Y., N. Takahashi, et al. (1999). "Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CDR40, CD30L, CD27L, and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackie virus B3." *J Pathol* 188(4): 423-30.
- 20 Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* 2(2): 116-26.
- Stuber, E., M. Neurath, et al. (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells." *Immunity* 2(5): 507-21.
- 25 Sugamura, K., N. Ishii, et al. (2004). "Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40." *Nat Rev Immunol* 4(6): 420-31.
- Takasawa, N., N. Ishii, et al. (2001). "Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones." *Jpn J Cancer Res* 92(4): 377-82.
- 30 Tanaka, T., F. Kitamura, et al. (1993). "Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice." *J Exp Med* 178(3): 1103-7.
- 35 Taylor, L., M. Bachler, et al. (2002). "In vitro and in vivo activities of OX40 (CD134)-IgG fusion protein isoforms with different levels of immune-effector functions." *J Leukoc Biol* 72(3): 522-9.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4): 1333-7.
- 40 Tittle, T. V., A. D. Weinberg, et al. (1997). "Expression of the T-cell activation antigen, OX-40, identifies alloreactive T cells in acute graft-versus-host disease." *Blood* 89(12): 4652-8.
- Totsuka, T., T. Kanai, et al. (2003). "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(4): G595-603.
- 45 Tsukada, N., H. Akiba, et al. (2000). "Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* 95(7): 2434-9.
- Ukyo, N., T. Hori, et al. (2003). "Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response." *Immunology* 109(2): 226-31.
- 50 Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers." *J Exp Med* 190(8): 1115-22.
- 55 Watanabe, T., J. Masuyama, et al. (2006). "CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells." *Clin Immunol* 120:247-259.
- Weatherill, A. R., J. R. Maxwell, et al. (2001). "OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells in vivo." *Cell Immunol* 209(1): 63-75.
- Weinberg, A. D. (2002). "OX40: targeted immunotherapy-implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines." *Trends Immunol* 23(2): 102-9.
- 60 Weinberg, A. D., M. Lemon, et al. (1996). "OX-40 antibody enhances for autoantigen specific V beta 8.2+ T cells within the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* 43(1): 42-9.

# ES 2 938 625 T3

Weinberg, A. D., K. W. Wegmann, et al. (1999). "Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis." *J Immunol* 162(3): 1818-26.

5

Zingoni, A., T. Sornasse, et al. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+T cells via OX40-OX40 ligand interactions." *J Immunol* 173(6): 3716-24.

WO 95/12673

10

WO 95/21251

## REIVINDICACIONES

5 1. Anticuerpo aislado o purificado que se une específicamente a un epítopo en una secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de OX40, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o híbrido, en el que el anticuerpo comprende:

la secuencia madura de SEC ID Nº: 9, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y  
 10 la secuencia madura de SEC ID Nº: 10, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma; o  
 la secuencia madura de SEC ID Nº: 44, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y  
 15 la secuencia madura de SEC ID Nº: 45, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma; o  
 la secuencia madura de SEC ID Nº: 46, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma, y  
 20 la secuencia madura de SEC ID Nº: 47, o una secuencia con una identidad de por lo menos 95% con la misma,  
 o un fragmento del mismo seleccionado de entre Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv) o  
 Fvs unidos por disulfuro (sdFv).

2. Anticuerpo, o fragmento, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:

25 la secuencia madura de SEC ID Nº: 9; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 9 con 1-3 sustituciones de aminoácido en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 9, y

30 la secuencia madura de SEC ID Nº: 10; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 10 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 10;

o

35 la secuencia madura de SEC ID Nº: 44; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 44 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 44, y

40 la secuencia madura de SEC ID Nº: 45; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 45 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 45;

o

45 la secuencia madura de SEC ID Nº: 46; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 46 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 46, y

50 la secuencia madura de SEC ID Nº: 47; o la secuencia madura de SEC ID Nº: 47 con 1-3 sustituciones de aminoácido y en el que el anticuerpo retiene la actividad del anticuerpo que comprende la secuencia madura de SEC ID Nº: 47.

3. Anticuerpo, o fragmento, según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende:

55 la secuencia madura de SEC ID Nº: 9 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 10, o  
 la secuencia madura de SEC ID Nº: 44 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 45, o  
 la secuencia madura de SEC ID Nº: 46 y la secuencia madura de SEC ID Nº: 47.

4. Anticuerpo, o fragmento, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG, opcionalmente un anticuerpo IgG1.

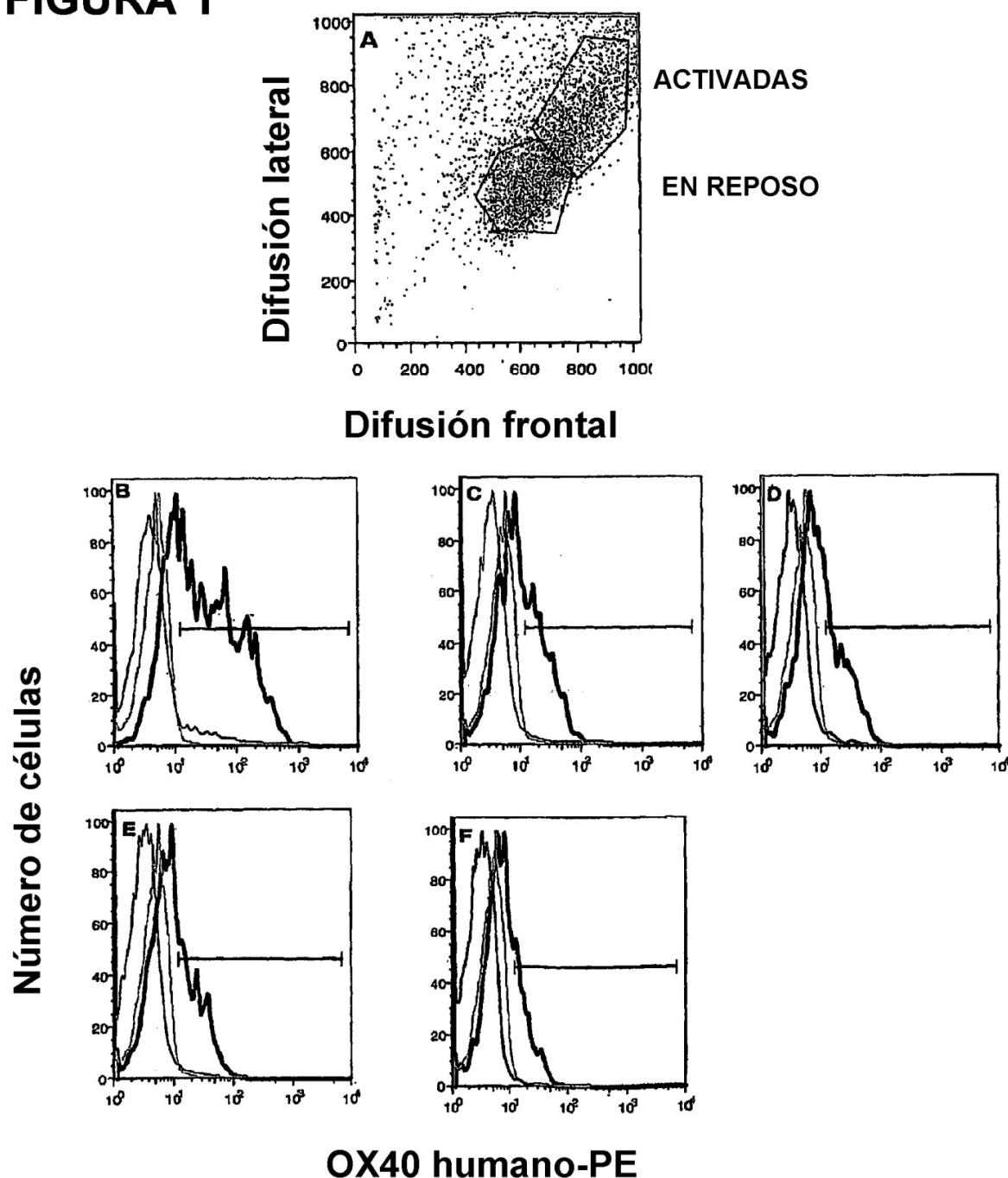
60 5. Anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento presenta actividad antagonista.

65 6. Anticuerpo, o fragmento, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

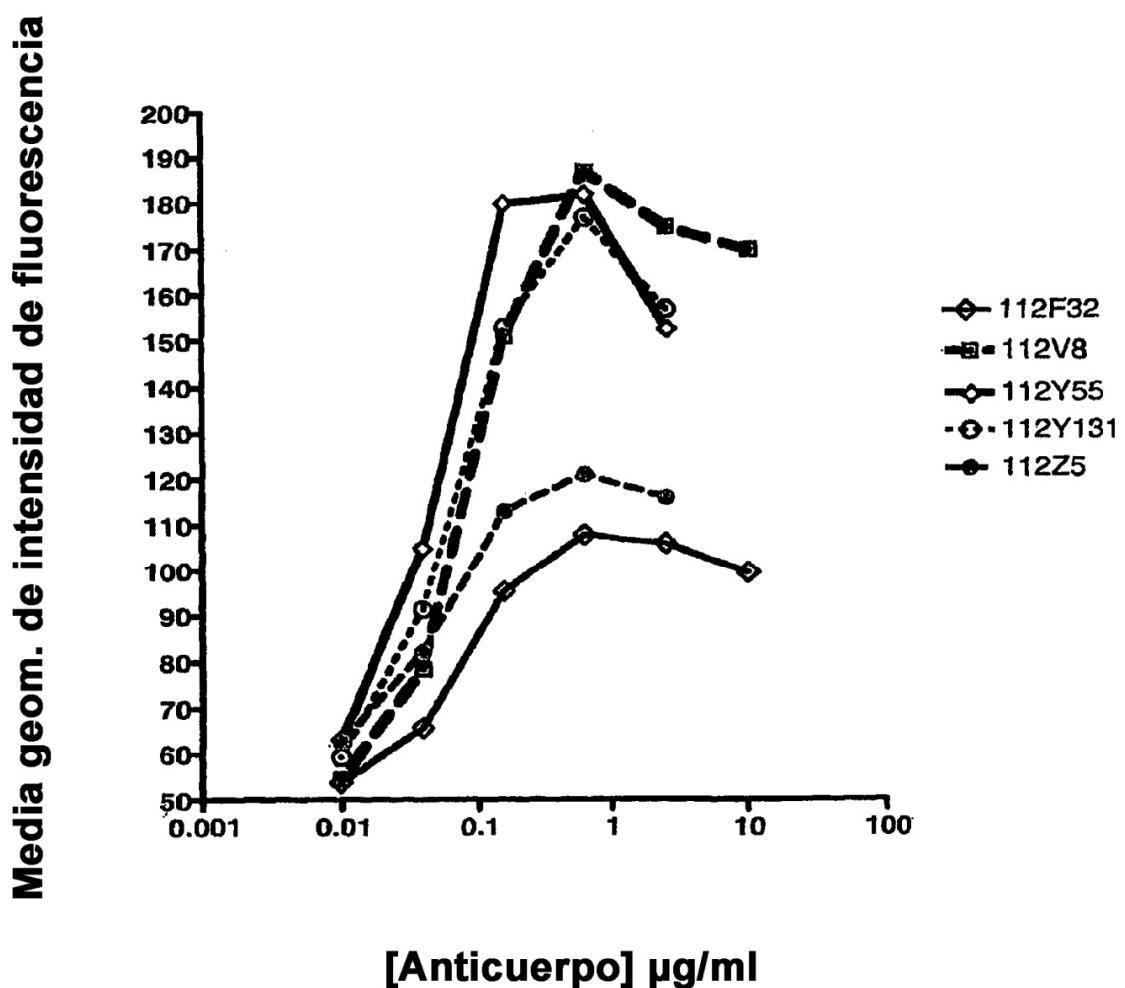
a) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la unión del ligando OX40 a OX40,

- 5 b) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la unión del ligando OX40 a las células T activadas,
- c) el anticuerpo o fragmento modula la señalización celular mediada por OX40 o modula una respuesta celular mediada por OX40,
- d) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene la señalización celular mediada por OX40,
- 10 e) el anticuerpo o fragmento inhibe o previene una respuesta celular mediada por OX40, en el que la respuesta celular mediada por OX40 comprende la proliferación de linfocitos, la expresión de citocinas, la supervivencia de linfocitos, la activación de NF- $\kappa$ B, el mantenimiento de la actividad de PKB (Akt), o la regulación por incremento de la supervivencia,
- 15 f) el anticuerpo o fragmento induce la lisis de las células que expresan OX40 de EL-4 humanas o células T humanas activadas mediada por linfocitos citolíticos naturales, macrófagos o neutrófilos, en el que la lisis celular específica porcentual (%) inducida a 10  $\mu$ g/ml de anticuerpo o fragmento es de aproximadamente 15 a 75%, 25 a 65%, 30 a 60%, o 50-100%, o
- 20 g) el anticuerpo o fragmento reduce, disminuye o previene un síntoma de la enfermedad del injerto contra el hospedador en un modelo de enfermedad de xenoinjerto hospedador aguda o crónica, o en el que el anticuerpo o fragmento provoca una remisión o regresión de la enfermedad del injerto contra el hospedador en un modelo de enfermedad de xenoinjerto hospedador aguda o crónica.
- 25 7. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
8. Anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición farmacéutica según la reivindicación 7 para la utilización como un medicamento.
- 30 9. Anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición farmacéutica según la reivindicación 7 para la utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno seleccionada/o de entre enfermedad del injerto contra el hospedador, trastorno autoinmunitario, enfermedad o trastorno inmunitaria/o crónica/o o aguda/o, rechazo de trasplante e inflamación.
- 35 10. Anticuerpo o fragmento o composición farmacéutica según la reivindicación 9 para la utilización según la reivindicación 9, en el/la que la inflamación se encuentra presente en pulmón, articulación, músculo, piel, sistema nervioso central o periférico, o intestino.
- 40 11. Anticuerpo o fragmento o composición farmacéutica según la reivindicación 9 para la utilización según la reivindicación 9, en el/la que el trastorno autoinmunitario es seleccionado de entre: artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, celiaquía, soriasis, nefritis lúpica proliferativa, miopatía granulomatosa y polimiositis.

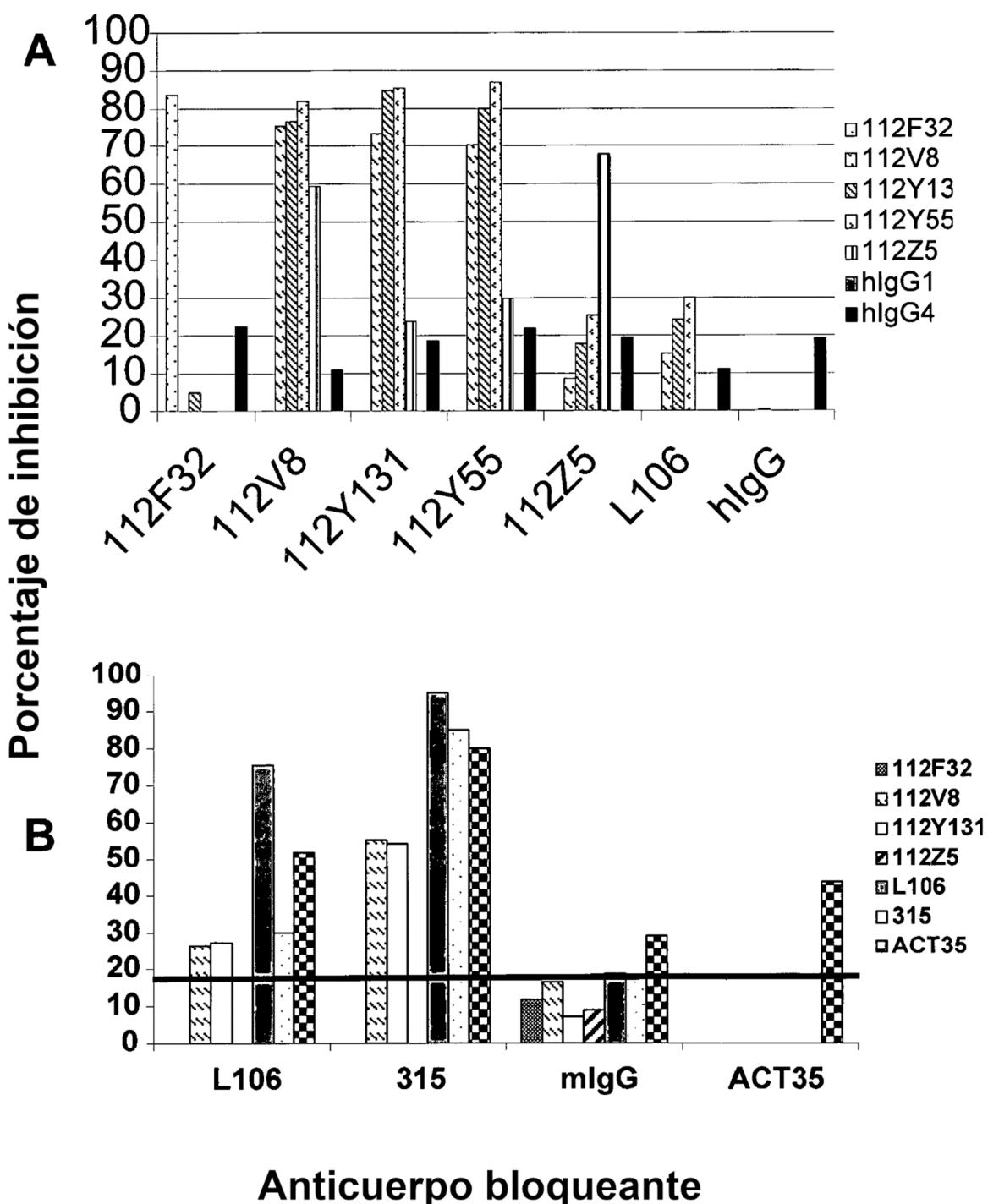
**FIGURA 1**



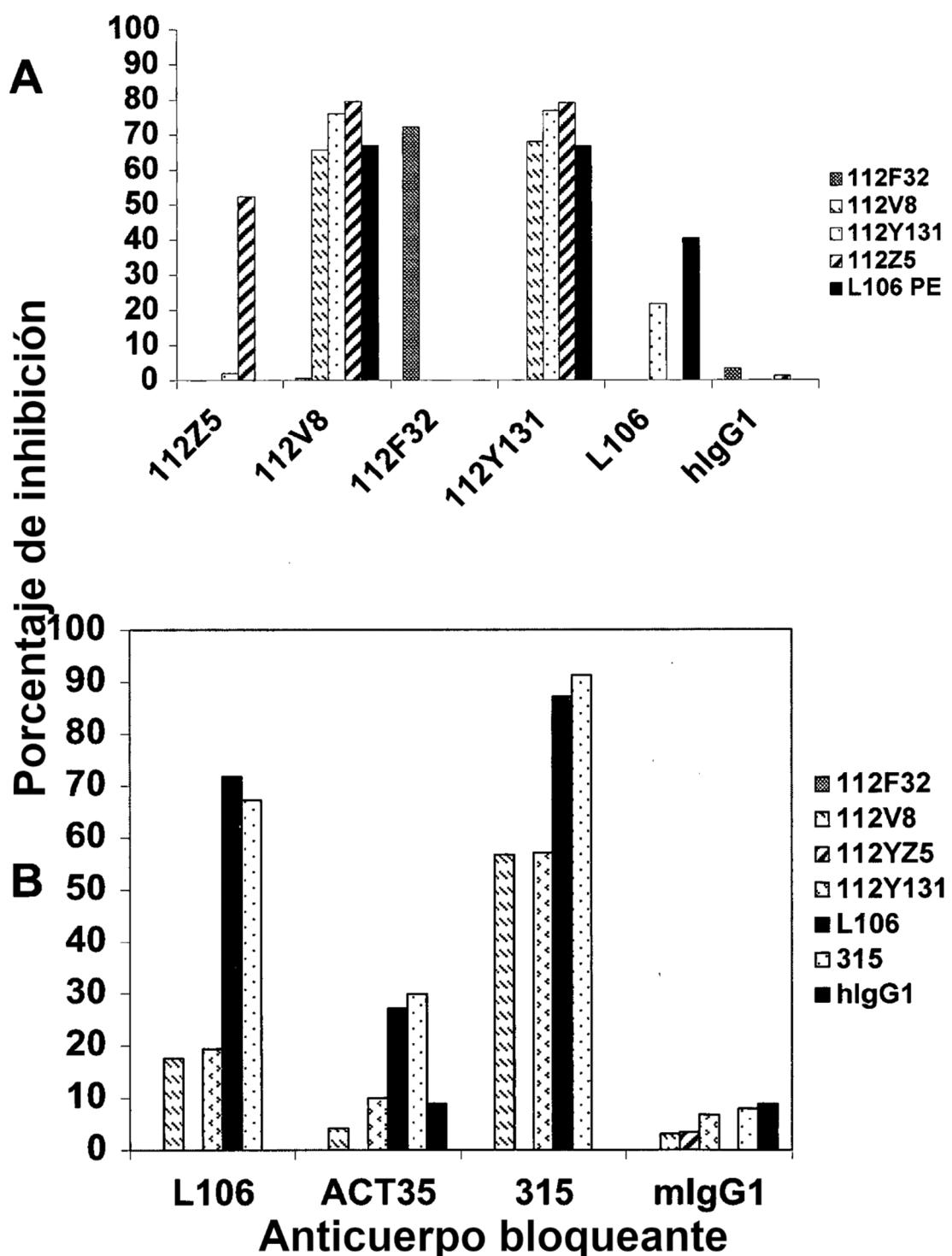
## Figura 2

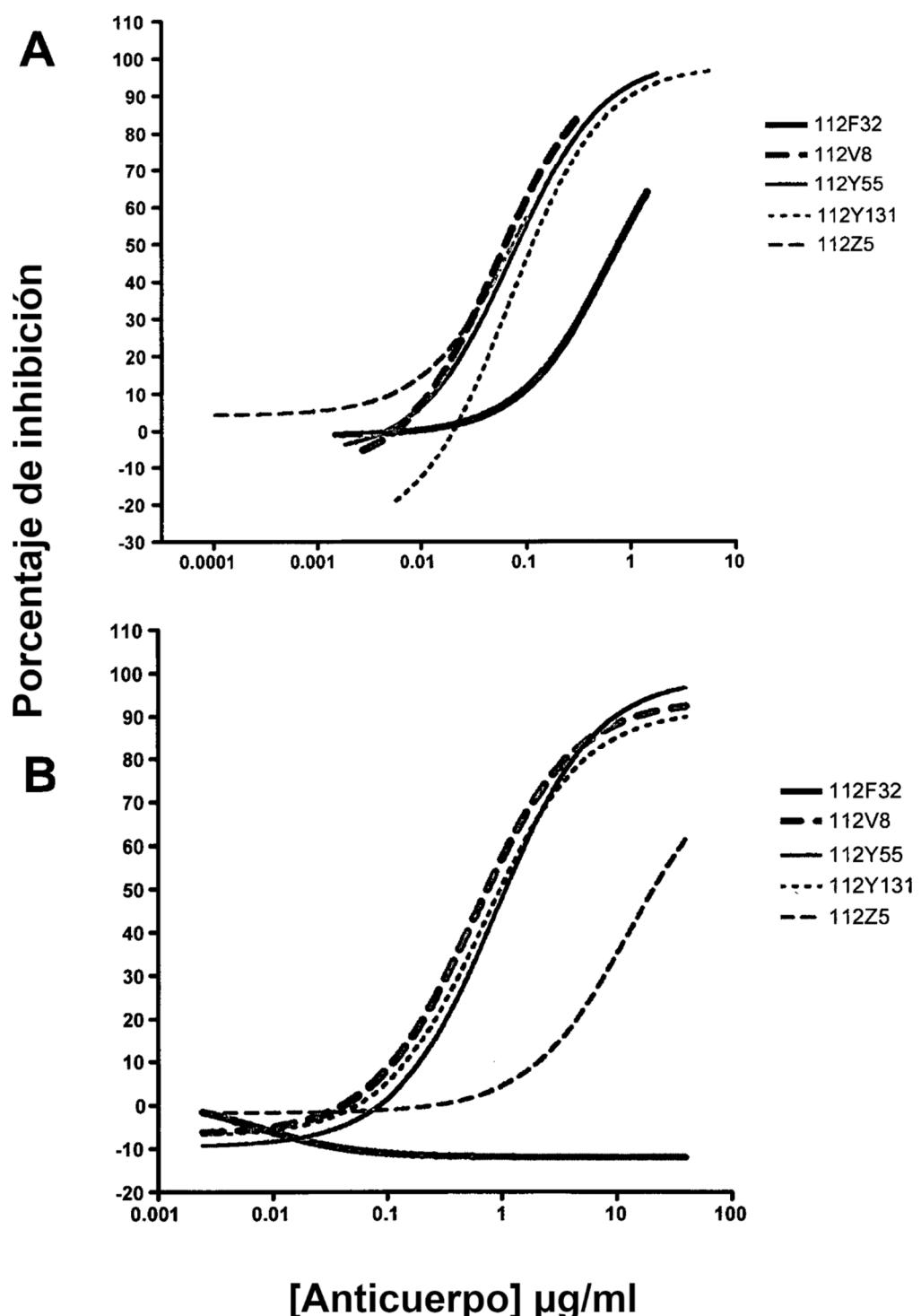


# Figura 3

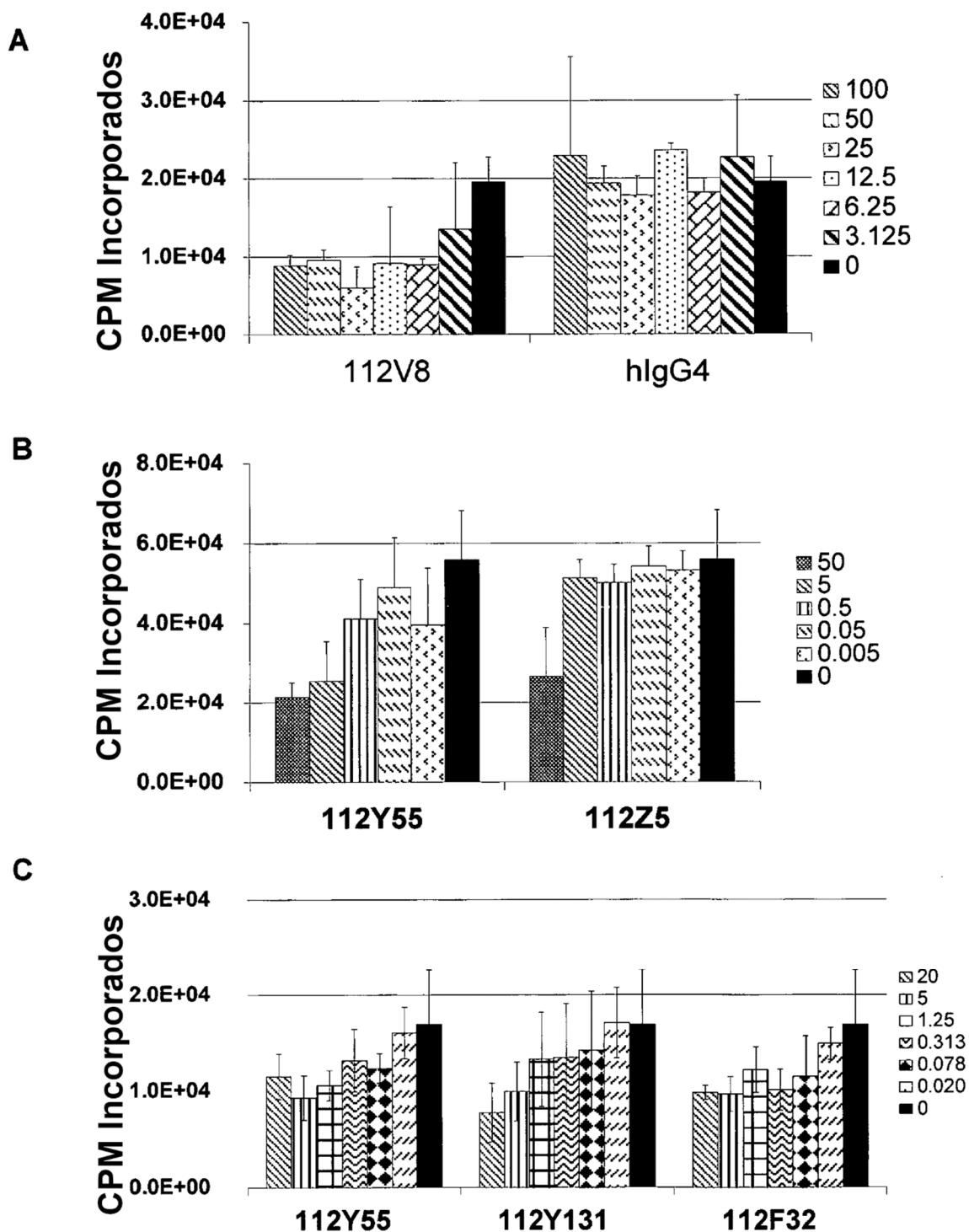


# Figura 4



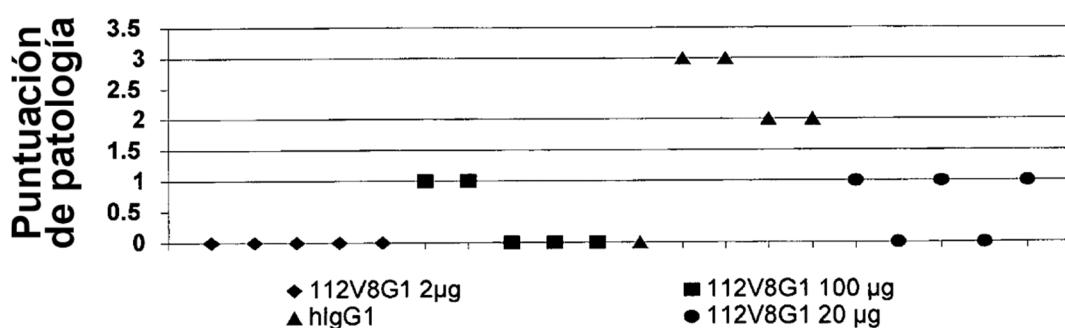
**Figura 5**

# Figura 6

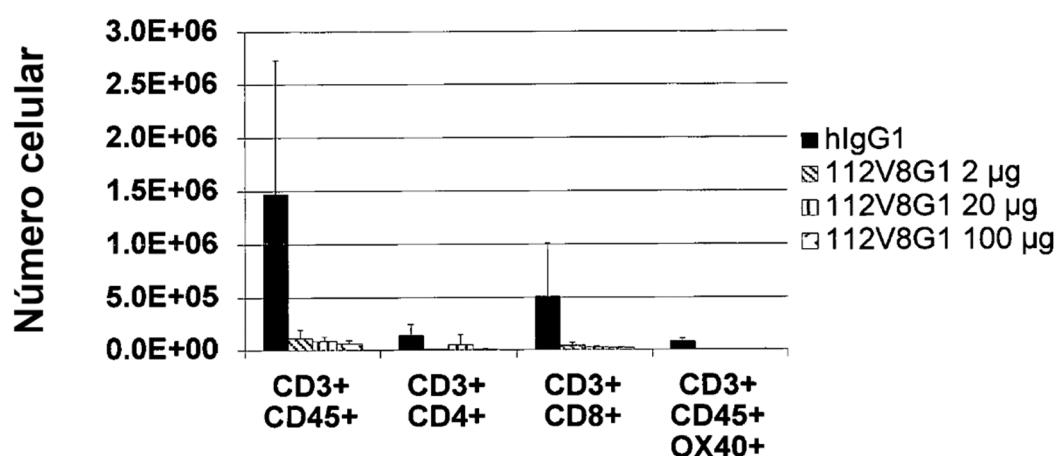


# Figura 7

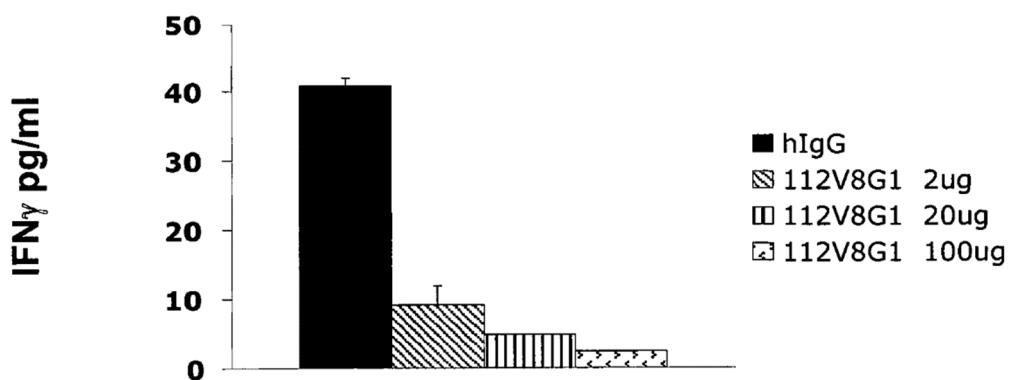
A.



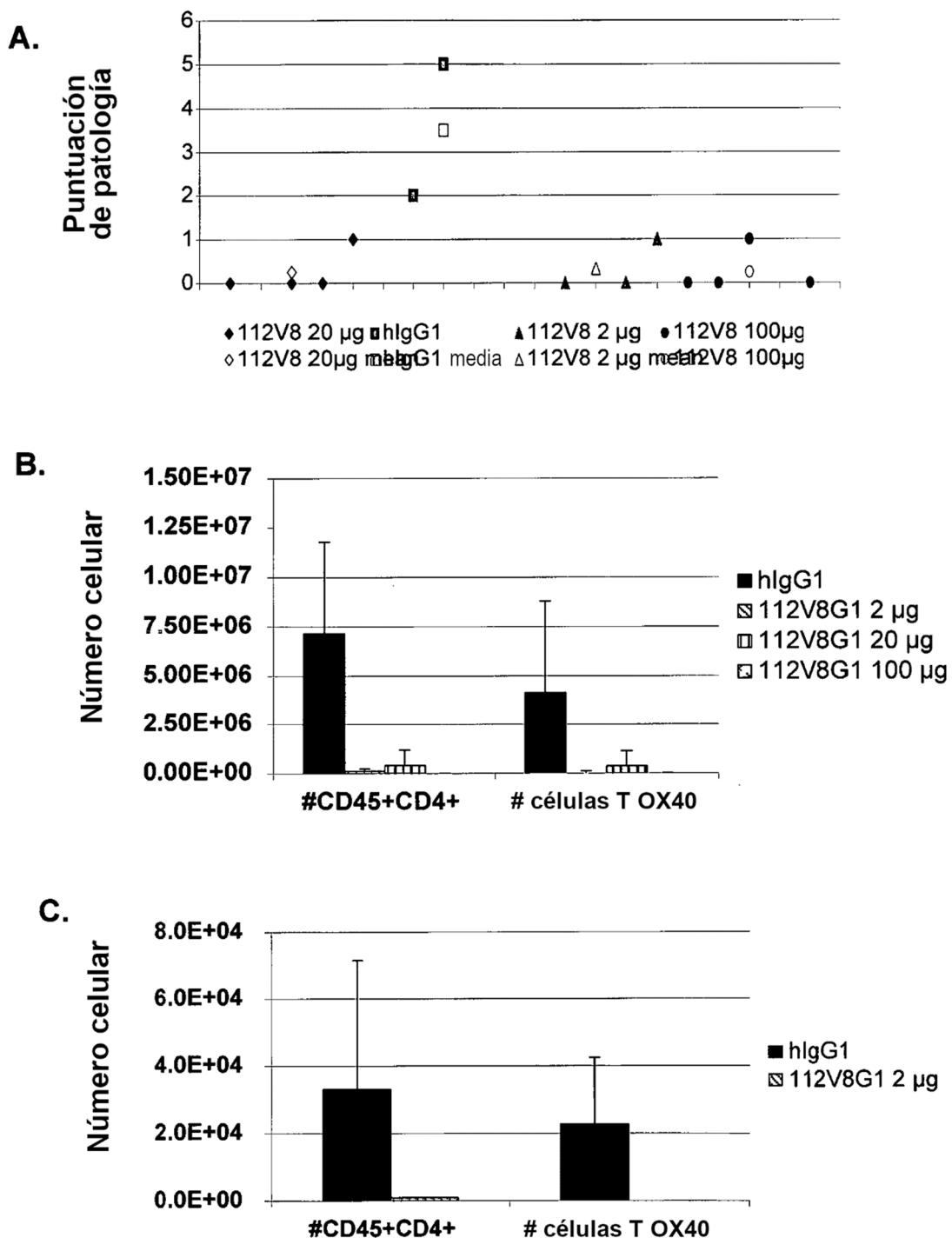
B.



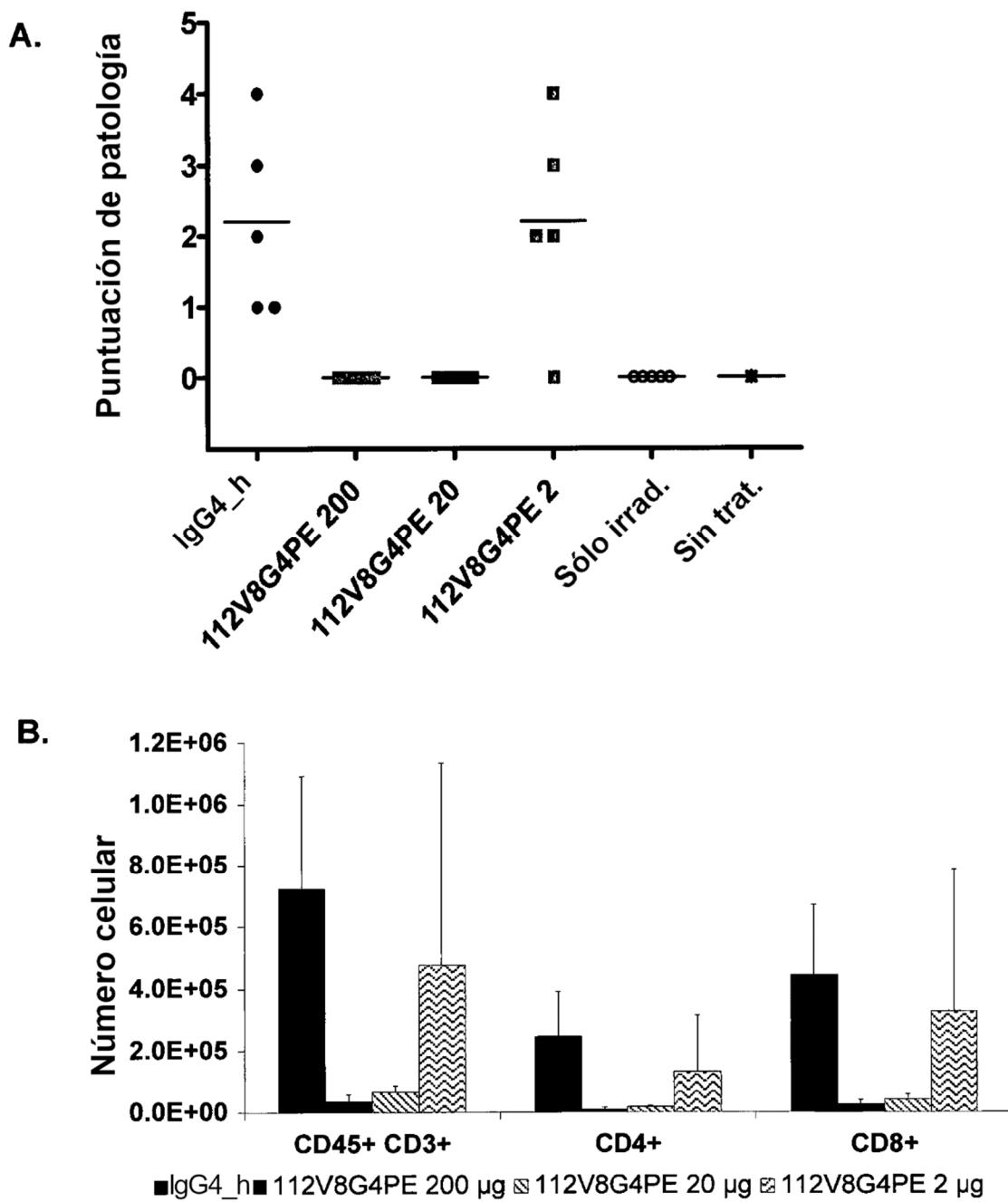
C.



# Figura 8

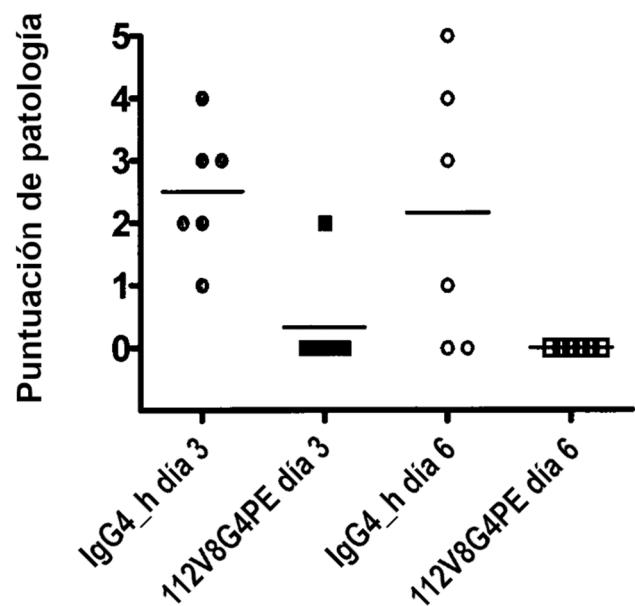


# Figura 9



## Figura 9

C.



**Figura 10**

