



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 909**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01) **C12N 15/70** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01) **C07K 17/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05021058 .2**

96 Fecha de presentación : **03.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1642974**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Receptores de Fc solubles recombinantes.**

30 Prioridad: **03.12.1998 EP 98122969**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2011**

73 Titular/es: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
Hofgartenstrasse 2  
80539 München, DE**

72 Inventor/es: **Sondermann, Peter;  
Huber, Robert y  
Jakob, Uwe**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 366 909 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

## Receptores de Fc solubles recombinantes

La presente invención se refiere a preparaciones cristalinas de un receptor de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$  soluble recombinante, un complejo de receptor de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$  soluble recombinante/inmunoglobulina, y especialmente al uso de tal preparación cristalina para la generación de datos de la estructura cristalina de receptores de Fc, así como a inhibidores de FcR.

También se describen receptores de Fc solubles recombinantes (FcR), ácidos nucleicos recombinantes que codifican tales receptores de Fc, células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos correspondientes, así como un procedimiento para la determinación de la cantidad de anticuerpos de un cierto tipo contenidos en la sangre, plasma o suero de un paciente, un procedimiento para la determinación del estado inmunológico de pacientes con enfermedades crónicas del sistema inmunitario, y un procedimiento para la identificación de sustancias en vista de su capacidad para actuar como inhibidores del reconocimiento y unión de anticuerpos a los receptores celulares respectivos. Además, se describen composiciones farmacéuticas que contienen los FcR solubles recombinantes, y composiciones farmacéuticas que contienen los inhibidores de FcR.

También se describe un receptor de Fc recombinante acoplado a una fase sólida, por ejemplo un material soporte de cromatografía. El uso de tal material de cromatografía se basa en la absorción de inmunoglobulinas procedentes de un fluido corporal de pacientes, o de sobrenadantes de cultivo de células productoras de inmunoglobulinas.

Los receptores de Fc (FcR) desempeñan un papel fundamental en la defensa del organismo humano contra las infecciones. Después de que los patógenos han logrado acceso a la circulación sanguínea, son opsonizados por las inmunoglobulinas (Ig). Debido a su multivalencia, los inmunocomplejos resultantes se unen con gran avidez a las células portadoras de FcR, conduciendo al agrupamiento de los FcR, lo que desencadena varias funciones efectoras (Metzger, H., 1992A). Estas incluyen, dependiendo del tipo de FcR expresado y de las proteínas asociadas, endocitosis con neutralización subsiguiente de los patógenos y presentación de antígenos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), secreción de mediadores, o la regulación de la producción de anticuerpos (Fridman et al, 1992; van de Winkel y Capel, 1993).

Existen FcR específicos para todas las clases de Ig, siendo aquellos para IgG los más abundantes con la más amplia diversidad. Junto con el receptor de alta afinidad para IgE (Fc $\epsilon$ R1a), Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIIIa (CD16), aparecen como proteínas transmembránicas de tipo I, o en formas solubles (sFcR), pero existe también una forma del Fc $\gamma$ RIII anclada a glucosilfosfatidilinositol (Fc $\gamma$ RIIIb). Además, los Fc $\gamma$ R existen en diversas isoformas (Fc $\gamma$ R1a, b1, b2, c; Fc $\gamma$ R1a 1–2, b1–3, c) y alelos (Fc $\gamma$ R1a1–HR, –LR; Fc $\gamma$ RIIIb–NA1, –NA2) (van de Winkel y Capel, 1993). En contraste con las partes extracelulares homólogas globales, los dominios que se extienden sobre la membrana y los dominios citoplásmicos difieren. Pueden estar totalmente suprimidos, o tener un tamaño de 8 kDa. Pueden contener un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) de 26 aminoácidos, como en Fc $\gamma$ R1a, o un motivo inhibidor (ITIM) respectivo de 13 aminoácidos en Fc $\gamma$ RIIIb, implicado en transducción de señales (Amigorena et al, 1992).

A juzgar por la separación conservada de cisteínas, la parte extracelular de los FcR consiste en tres (Fc $\gamma$ RI, CD64) o dos (Fc $\epsilon$ RI, Fc $\gamma$ RII, CD32 y Fc $\gamma$ RIII, CD16) dominios similares a Ig (10 kDa/dominio), y por lo tanto pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estos receptores altamente glucosilados son homólogos, y la identidad global en la secuencia de aminoácidos entre los Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R1a excede el 50% en sus regiones extracelulares. No obstante, la afinidad de los FcR a sus ligandos varía ampliamente. La mayor afinidad de  $\approx 10^8 \text{M}^{-1}$  del Fc $\gamma$ RI al fragmento Fc se asigna a su tercer dominio, mientras que los otros Fc $\gamma$ R con dos dominios tienen una afinidad por IgG que varía entre  $10^5$  y  $10^7 \text{M}^{-1}$ . La afinidad del Fc $\epsilon$ R1a de dos dominios por IgE supera de lejos estos valores, con una constante de  $10^{10} \text{M}^{-1}$  (Metzger, H., 1992B). En contraste con los FcR mencionados, el receptor de baja afinidad para IgE, Fc $\epsilon$ R2, representa una proteína transmembránica de tipo II, y muestra una menor homología.

Hasta ahora, los FcR usados para la cristalización han sido expresados en células hospedantes eucariotas. Gastinel et al. (1992) describen la expresión heteróloga de receptores de Fc de las células epiteliales intestinales del neonato (FcRn) en una estirpe celular eucariota, y una preparación cristalina para esos receptores de Fc.

Los Fc $\gamma$ R se expresan en un patrón definido en todas las células inmunológicas activas. Fc $\gamma$ RI se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos, y puede ser inducido en neutrófilos y eosinófilos. El papel fisiológico de Fc $\gamma$ RI se desconoce todavía, dado que la expresión en monocitos no es vital (Ceuppens et al, 1988). La forma de Fc $\gamma$ RIII anclada a GPI (Fc $\gamma$ RIIIb) se expresa exclusivamente en granulocitos. Debido a su parte citoplásmica ausente, la transducción de señales en la célula ocurre solamente por la vía de otras proteínas transmembránicas, como el receptor del complemento tipo 3 (CR3), que puede asociarse al menos con Fc $\gamma$ RIIIb (Zhou et al, 1993; Poo et al, 1996). Fc $\gamma$ RIIIa se expresa principalmente en monocitos y macrófagos, pero sólo en conjunción con proteínas asociadas (v.g., cadenas  $\alpha$  o  $\gamma$ ). Fc $\gamma$ RII es el receptor con la distribución más amplia en células inmunocompetentes, y está implicado principalmente en la endocitosis de los inmunocomplejos.

Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIb difieren en su región extracelular en sólo un 7% de los restos de aminoácidos. No obstante, ambas formas se pueden distinguir por sus características de unión a las subclases IgG humanas y de ratón (van de Winkel y Capel, 1993) y su diferente afinidad por las IgG humanas (Sondermann et al, 1998A). La situación se hace más complicada aún por el polimorfismo respondedor alto/respondedor bajo (HR/LR) de Fc $\gamma$ RIIa, denominado después de la capacidad de las células T procedentes de algunos individuos para responder a la mitogénesis inducida por IgG1 murina (Tax et al, 1983). Más tarde, se encontró que los dos intercambios en la secuencia de aminoácidos entre la forma LR y la forma HR modifican la capacidad para unirse a IgG2 humana, lo que conduce a la hipótesis de que al menos una de ellas está implicada en la unión a IgG (Hogarth et al, 1992).

La solicitud de patente europea EP 0321842 describe la expresión de Fc $\epsilon$ R soluble en agua, muy bioactivo, en células derivadas de organismos multicelulares, y su uso. Este Fc $\epsilon$ R se puede unir a IgE, y evita la unión de IgE a eosinófilos. Por lo tanto, este receptor controla los efectos inflamatorios de la alergia. Además, es adecuado para el tratamiento o profilaxis de reacciones locales o alérgicas inducidas por IgE.

Galon et al. (Immunology Letters, 44 (1995) 175-181) describen receptores Fc $\gamma$ R solubles, su expresión en diferentes tipos de células eucariotas (v.g., infocitos, macrófagos), y su papel en las respuestas inmunitarias.

Sondermann et al. (The EMBO Journal, Vol. 18, nº 5, p. 1095-1103 (1999)) describen la estructura cristalina de Fc $\gamma$ RIIb soluble. Se muestran los diferentes dominios que son necesarios para la unión a IgG. Además, los autores proponen un modelo para el complejo sFc $\gamma$ RIIb:IgG.

También es descrita por Sondermann y Jacob (Biol. Chem., Vol. 380, p. 717-721, (1999)) la expresión de la parte extracelular de Fc $\gamma$ RIIb humano en *E. coli*. Después de la expresión, el receptor se purificó, se caracterizó y se estudió para determinar la actividad de unión a anticuerpos y a IgG. Adicionalmente, el receptor se cristalizó.

En contraste con el papel beneficioso que juegan los FcR en el individuo sano, también transmiten la estimulación del sistema inmunitario en las alergias (Fc $\epsilon$ R1a) o enfermedades autoinmunitarias. Además, algunos virus emplean Fc $\gamma$ R para tener acceso a las células, como el VIH (Homsy et al, 1989) y el dengue (Littau et al, 1990), o ralentizan la respuesta inmunitaria bloqueando los Fc $\gamma$ R, como en el caso del ébola (Yang et al, 1998) y el virus del sarampión (Ravanel et al, 1997).

Por tanto, el objeto que subyace a la presente invención fue proporcionar receptores que fuesen fáciles de producir y pudiesen ser usados ventajosamente para aplicaciones médicas o de diagnóstico. Además, fue un objeto de la invención proporcionar receptores solubles que exhibiesen una especificidad de unión y actividad que fuese análoga a la de los receptores que existen naturalmente en el cuerpo humano, y que, adicionalmente, hiciesen posible producir cristales adecuados para una determinación de la estructura.

Este objeto se logra por medio de receptores de Fc solubles recombinantes que consisten solamente en la porción extracelular del receptor, y no están glucosilados. Los receptores de acuerdo con la presente invención se caracterizan por lo tanto por la ausencia de dominios transmembránicos, péptidos de señal y glucosilación.

La presente invención se refiere a preparaciones cristalinas de tales receptores de Fc $\gamma$  y Fc $\epsilon$  solubles. Esto es debido a que las moléculas de IgG e IgE son características para una multitud de enfermedades y patologías, de manera que su determinación y formas posibles de influirlas son de gran interés. Las Figuras 11 y 12 muestran un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las partes extracelulares de algunos Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ RI. Los FcR según la invención incluyen todas estas secuencias o sus partes que todavía retienen la capacidad de unión a anticuerpos y/o cristalización apropiada.

En una realización particularmente preferida de la invención, el receptor FcR soluble recombinante es un receptor Fc $\gamma$ RIIb. Además, se prefiere particularmente que el receptor sea de origen humano. En una realización particularmente preferida, contiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO: 3 ó 4.

De acuerdo con la presente invención, la preparación de los receptores de Fc solubles tiene lugar en células procariotas. Después de dicha expresión, en las células procariotas se forman cuerpos de inclusión insolubles que contienen la proteína recombinante, facilitando así la purificación por separación de los cuerpos de inclusión de otros componentes celulares antes que tenga lugar la renaturalización de las proteínas contenidas en ellos. La renaturalización de los FcR de acuerdo con la presente invención que están contenidos en los cuerpos de inclusión puede tener lugar principalmente de acuerdo con métodos conocidos. La ventaja de la preparación en células procariotas, la producción de cuerpos de inclusión y los receptores de Fc solubles recombinantes así obtenidos hacen que sea posible obtener una preparación de FcR muy pura y, en particular, también muy homogénea. Asimismo, debido a la ausencia de glucosilación, el producto obtenido presenta una gran homogeneidad.

Los receptores de Fc solubles producidos hasta ahora por medios recombinantes exhibían particularmente la desventaja de que se requería una purificación mucho más elaborada, dado que se expresaban en células eucariotas, y, debido a la glucosilación, que no siempre es uniforme en las células eucariotas, estos productos eran también menos homogéneos.

Los receptores de Fc solubles recombinantes de acuerdo con la presente invención hacen incluso posible producir cristales, adecuados para uso en análisis por rayos X, como se explicará más adelante en la descripción de realizaciones adicionales de la invención. Los FcR de la presente invención exhiben además prácticamente la misma actividad y especificidad que los receptores existentes naturalmente in vivo.

- 5 También se describe un ácido nucleico recombinante que tiene una secuencia que codifica un receptor de Fc soluble recombinante según la presente invención.

El ácido nucleico puede contener solamente las secuencias codificantes o, adicionalmente, secuencias vectores y/o, en particular, secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente a la secuencia que codifica el FcR recombinante, como promotores, operadores y similares.

- 10 El ácido nucleico puede contener una secuencia como se muestra en una de SEC ID NO: 7 a SEC ID NO: 12. Para comparación, SEC ID NO: 13 y SEC ID NO: 14 muestran las secuencias de tipo salvaje respectivas que codifican Fc $\gamma$ RIIb y Fc $\epsilon$ RIa. Las SEC ID Nos: 15–18 muestran las secuencias de tipo salvaje para Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIII y Fc $\epsilon$ RII.

- 15 Si el ácido nucleico contiene secuencias vectores, entonces éstas son preferiblemente secuencias de uno o varios vectores de expresión procariotas, preferiblemente de vectores pET. Si se desea, también pueden estar contenidos en el ácido nucleico recombinante cualesquiera otras funciones o componentes conocidos de vectores de expresión. Estos pueden ser, por ejemplo, genes de resistencia que permiten una selección efectiva de las células hospedantes transformadas.

- 20 También se describe una célula hospedante que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica los receptores de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$ . Como se menciona de forma repetida anteriormente, la célula hospedante es preferiblemente una célula hospedante procariota, particularmente una célula de *E. coli*.

- 25 Los receptores de Fc solubles recombinantes de acuerdo con la presente invención se pueden usar para una multitud de exámenes o aplicaciones, debido a que reaccionan específicamente con anticuerpos. In vivo, los receptores de Fc solubles son inmunorreguladores potentes que, si están presentes en niveles elevados, dan como resultado una supresión notable del sistema inmunitario, lo que conduce a muchos efectos parcialmente conocidos y parcialmente no comprendidos todavía. Basándose en estos efectos, también se describen varias aplicaciones de los receptores de Fc.

- 30 Una de tales aplicaciones es un procedimiento para la determinación de la cantidad de anticuerpos de un cierto tipo en la sangre o suero de un paciente, que se caracteriza por el uso de un FcR soluble recombinante en un inmunoensayo, y la determinación de la presencia de complejos FcR-anticuerpo. Dicho ensayo permite escrutar la presencia de cierta clase de anticuerpo, y permite también la determinación de la cantidad de anticuerpos presentes en la sangre, plasma o suero de un paciente.

- 35 Cualquier tipo de inmunoensayo es en principio adecuado para el uso, con tal de que se pueda detectar de ese modo la presencia de complejos FcR-anticuerpo. Son adecuados tanto ELISA (inmunoensayo inmunosorbente unido a enzima), particularmente ensayos de tipo sándwich, como RIA (radioinmunoensayo), pero también lo son métodos de ensayo competitivos. Cuando se va a examinar la presencia y/o la cantidad de anticuerpos IgE, se usa Fc $\epsilon$ R como receptor soluble recombinante según la presente invención. En particular, este método es adecuado y ventajoso para determinar una predisposición a o manifestación de una alergia.

- 40 Además, es adecuado un método en el cual se va a determinar y, si es necesario, cuantificar la presencia de FcR solubles. Para dicha determinación se usa preferiblemente un método de inmunoensayo competitivo, en el cual se usa como reactivo de competición un receptor soluble recombinante, más preferiblemente un Fc $\gamma$ R recombinante. Por medio de este ensayo entre otros, se puede determinar en un inmunoensayo competitivo el estado inmunológico de pacientes con enfermedades crónicas del sistema inmunitario. Enfermedades crónicas en el sentido de estos procesos son, por ejemplo, SIDA, SLE (lupus eritematoso sistémico), MM (mieloma múltiple), o artritis reumatoide, o, en el caso de Fc $\epsilon$ RII, B-CLL (Gordon et al., 1987), síndrome hiper IgE (Sarfati et al., 1988) o HCL (Small et al., 1990).

- 45 Un uso adicional ventajoso del receptor recombinante se basa en el escrutinio de sustancias con vistas a su capacidad para actuar como inhibidores del reconocimiento y unión de anticuerpos a los receptores celulares respectivos.

- 50 Por medio de técnicas de escrutinio modernas, tales como HTPS (escrutinio de alto rendimiento), en combinación con placas de microtitulación de múltiples pocillos y aparatos de pipeteado automáticos, actualmente es posible ensayar simultáneamente una multitud de sustancias en cuanto a propiedades específicas. Dado que los FcR se pueden producir fácilmente a coste bajo, también se pueden usar en tales ensayos en serie por medio de los cuales se pueden identificar fácilmente sustancias que tienen un efecto inhibidor.

Se prefiere particularmente tal uso según el cual los receptores de Fc de acuerdo con la presente invención se usan para encontrar o escrutar inhibidores capaces de inhibir el reconocimiento y la unión de los anticuerpos respectivos al receptor particular de interés.

5 Un área adicional de aplicación de las sustancias reside en el campo farmacéutico. Por tanto, también se describe una composición farmacéutica que comprende, como agente activo, un FcR soluble recombinante. Esta composición farmacéutica puede comprender, por supuesto, sustancias portadoras y auxiliares útiles convencionales. Tales sustancias son conocidas por la persona experta en la técnica, debiendo tenerse en cuenta también el modo de administración. La composición farmacéutica se puede usar ventajosamente para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunitarias, alergias o enfermedades tumorales.

10 Formas solubles de los receptores de Fc, tales como Fc $\gamma$ RIII, median la regulación, específica del isotipo, del crecimiento de las células B y la producción de inmunoglobulinas. En un modelo de mieloma murino, sFcR suprime el crecimiento y la producción de inmunoglobulina de las células tumorales (Müller et al, 1985; Roman et al, 1988; Teillaud et al, 1990). Adicionalmente, sFcR se une a la IgG de la superficie en cultivos de células de mieloma humanas que segregan IgG, y efectúa la supresión del crecimiento de las células tumorales y la secreción de IgG.  
15 La exposición prolongada de estas células a sFcR da como resultado la citólisis de las células tumorales (Hoover et al, 1995).

También, las sobrereacciones del sistema inmunitario en las reacciones alérgicas, o debidas a una carga masiva de antígeno, se podrían reducir, por ejemplo, por aplicación intravenosa de FcR soluble (Ierino et al, 1993).

20 Por lo tanto, también se describe una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de SIDA, artritis reumatoide o mieloma múltiple, que contiene un receptor de Fc $\gamma$  soluble recombinante, y, preferiblemente, un receptor que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO: 3 ó 4.

Fue de gran interés la obtención de datos de la estructura cristalina de los receptores de Fc y/o de los complejos de receptor de Fc/Ig. Por una parte, son una clave para la comprensión de los mecanismos moleculares en el reconocimiento de los inmunocomplejos. Por otra parte, estos datos estructurales se pueden usar para descubrir  
25 características comunes en las estructuras de receptores de Fc diferentes y usar el conocimiento de las estructuras para generar inhibidores o identificar y producir nuevos receptores de anticuerpos artificiales.

También fue de gran interés la obtención de información acerca de los sitios de unión concretos de las inmunoglobulinas a sus receptores respectivos en moléculas tridimensionales existentes naturalmente. A partir de  
30 ello se pueden obtener conclusiones todavía más precisas acerca de las interacciones entre anticuerpo y receptor, y también sobre cómo se pueden modular estas interacciones. A este respecto, modulación significa una intensificación de la interacción, o una reducción, que conduce a una inhibición, v.g., cubriendo los sitios de unión en una o más partes del complejo.

35 Para obtener tales datos de la estructura cristalina y la información de conformación, según la invención actualmente reivindicada, se usa una preparación cristalina del receptor de Fc soluble recombinante de acuerdo con la invención. Los FcR solubles recombinantes de acuerdo con la invención se pueden obtener sorprendentemente con una pureza suficiente para producir cristales que proporcionan datos fiables de determinación de la estructura de rayos X. Dicha cristalización no era posible con las moléculas receptoras producidas hasta ahora, debido principalmente a su falta de homogeneidad.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una preparación cristalina de un receptor de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$  según la invención. Aún otra realización de la presente invención es una preparación cristalina de un complejo de receptor de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$  soluble según la invención junto con la parte Fc de la inmunoglobulina relacionada. En los ejemplos se muestran realizaciones particularmente preferidas, así como los datos de la estructura cristalina relevantes. Por la vía del análisis de la estructura de los cristales de las preparaciones cristalinas, se pudieron detectar los aminoácidos exactos de los complejos de receptor de Fc/Ig, que median el acoplamiento. Estos aminoácidos se  
45 muestran en Fig. 6a y 6b, y se indica también el tipo de unión entre los aminoácidos individuales de ambas moléculas en el complejo. Una realización adicional de la presente invención es por lo tanto el uso de una preparación cristalina de un receptor de Fc soluble recombinante para la generación de datos de la estructura de los cristales de los receptores de Fc. A partir de estos datos de la estructura de los cristales se puede obtener información acerca de la estructura tridimensional y los sitios activos para la unión de anticuerpos. Especialmente de  
50 forma preferible es el uso de una preparación cristalina de un complejo de receptor de Fc soluble recombinante de acuerdo con la invención y la molécula de inmunoglobulina correspondiente para la generación de datos de estructura cristalina para los complejos. Estos datos permiten determinar las interacciones reales que se forman entre las dos moléculas, y permiten por primera vez obtener información exacta acerca de la interacción de las moléculas, confiriendo con ello conocimiento acerca de posibles sitios para inhibición o intensificación de la unión.  
55 En base a la información obtenida a partir de los datos de la estructura cristalina, se pueden obtener las conclusiones necesarias para efectuar la modulación de la interacción entre el receptor de Fc y la inmunoglobulina. Esta modulación puede variar desde la intensificación hasta la inhibición completa hasta una inhibición de la unión.

Las aplicaciones señaladas son meramente realizaciones preferidas del uso de los datos de la estructura cristalina. También parecen posibles muchas otras aplicaciones.

Convenientemente, los datos estructurales para generación y/o identificación de inhibidores o nuevos receptores, respectivamente, se usan en un programa de modelización asistido por ordenador.

- 5 Son particularmente preferidas para la presente invención las estructuras de los Fc $\gamma$ R o Fc $\epsilon$ R, o complejos de FcR:fragmento de Fc, como se ejemplifican en las figuras y ejemplos. Tales estructuras se pueden usar para diseñar inhibidores, antagonistas y moléculas receptoras artificiales.

10 Programas de ordenador adecuados para diseño y escrutinio de fármacos asistido por ordenador son conocidos por la persona experta en la técnica, y generalmente están disponibles. Proporcionan la posibilidad de examinar miles de composiciones en el ordenador con vistas a su capacidad para unirse a una molécula determinada cuando se introducen en el ordenador los datos de estructura correspondientes. Con la ayuda de esta posibilidad, se puede examinar un gran número de composiciones químicas conocidas con respecto a su efecto inhibitorio o antagonista. La persona experta en la técnica requiere únicamente los datos de la estructura cristalina proporcionados por la presente invención y un programa de escrutinio disponible comercialmente (Program Flexx: De la GMD-German National Research Center for Information Technology, Schloss Birlinghoven, D-53754 Sankt Augustin, Alemania).  
15 Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención es el uso de los datos de la estructura cristalina obtenidos para el receptor de Fc soluble recombinante según la invención, y para los complejos del receptor de Fc soluble recombinante según la invención y la inmunoglobulina correspondiente, en un programa de modelización asistido por ordenador, para la identificación y producción de inhibidores del receptor de Fc.

20 Igualmente, una realización adicional de la presente invención es el uso de los datos de la estructura cristalina obtenidos para los receptores según la invención y los complejos de receptor/inmunoglobulina, respectivamente, para la identificación y preparación de nuevos receptores de Fc que se pueden usar, v.g., como antagonistas y competidores. Los datos de la estructura cristalina y los datos acerca de los aminoácidos implicados en la unión a los receptores de Fc obtenidos a partir de ellos pueden servir, por ejemplo, para generar inmunoglobulinas mutadas que también se pueden usar como inhibidores. Puede imaginarse que los inhibidores mutados o modificados químicamente están sometidos a unión fuerte y efectúan así un bloqueo de receptores. Por otra parte, los datos obtenidos para los sitios de unión de las inmunoglobulinas también se pueden usar para la identificación y/o preparación de inhibidores para moléculas de inmunoglobulina. Puesto que la presente invención muestra los sitios de unión al receptor, es fácil efectuar un bloqueo de los sitios de unión con la ayuda de moléculas relativamente simples. Por lo tanto, una materia objeto adicional de la presente invención es el uso de los datos de la estructura cristalina obtenidos para los complejos de FcR/Ig para la identificación y/o preparación de inhibidores de inmunoglobulinas.  
25 30

Tales inhibidores de FcR que tienen una estructura tridimensional que es complementaria al FcR soluble recombinante según la invención inhiben la unión de anticuerpos a los FcR.

- 35 Además, tales inhibidores de las inmunoglobulinas tienen preferiblemente una estructura tridimensional que es complementaria al sitio de unión de la inmunoglobulina para receptores de Fc solubles recombinantes, e inhiben la unión de inmunoglobulinas a los receptores de Fc.

40 El término "complementario" debe entenderse, dentro del marco de la invención, en el sentido de que las moléculas inhibitorias deben ser sustancias que sean capaces de cubrir al menos tantos sitios de unión en la inmunoglobulina o en el receptor de Fc de manera que la unión entre el receptor de Fc y la inmunoglobulina se debilite al menos decisivamente. El cubrimiento puede tener lugar tanto por unión a los aminoácidos que median la formación de complejos de cualquier componente, como también de manera que al menos ya no sea posible la formación de complejos, sea por inhibición estérica o por unión a aminoácidos adyacentes, cubriendo no obstante el aminoácido implicado en la unión del complejo entre el receptor de Fc y la inmunoglobulina.

- 45 En relación con la presente invención, fue posible por primera vez determinar los sitios exactos de unión y los aminoácidos implicados en la unión del anticuerpo y las moléculas receptoras de anticuerpos. Ahora es posible diseñar moléculas que se unen de forma específica, y escrutar composiciones candidato en el ordenador. Esto permite la selección de dichas composiciones a partir de una variedad de composiciones candidato posibles que pueden producir una inhibición suficiente de la formación de complejos entre el receptor de Fc y la inmunoglobulina.

- 50 Lo que es importante para los inhibidores de la invención es que, debido a su estructura y especificidad, son capaces de unirse a los FcR o las inmunoglobulinas, y prevenir así la unión normal entre los FcR y las partes constantes de los anticuerpos.

55 Preferiblemente, tales inhibidores de FcR o de IgG son pequeñas moléculas orgánicas que se pueden administrar fácilmente por vía oral. Son una alternativa interesante a la cortisona en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias y los rechazos de hospedante/injerto. Una molécula de este tipo suprimiría también las tasas de reinfección con ciertos virus, v.g. el virus del dengue, en el que el virus recubierto con anticuerpo se internaliza dependiente de Fc $\gamma$ RIIb (Littau et al, 1990), VIH, en el que, en células T CD4 positivas, una intensificación de

anticuerpos de la infección por VIH está mediada por Fc $\gamma$ RIII (Hormsy et al, 1989), o Ébola, en el que la glucoproteína segregada por el virus inhibe la activación precoz de los neutrófilos por bloqueo de sFc $\gamma$ RIII, lo que afecta a la respuesta del hospedante a la infección (Yang et al, 1998).

5 El desarrollo de inhibidores también conduce a sustancias que interfieren con el reconocimiento del IgE por sus receptores. A partir de la estructura modelada de Fc $\epsilon$ RI, ya se han desarrollado péptidos que inhiben in Vitro la desgranulación de mastocitos. Con el conocimiento ahora disponible de las estructuras de los receptores homólogos y el complejo de receptor-anticuerpo en detalle atómico, está abierta una nueva posibilidad para un diseño racional de fármacos.

10 El receptor de Fc se une entre los dos dominios CH<sub>2</sub> del fragmento de Fc en la denominada región bisagra inferior (Fig. 8). La región de unión del receptor de Fc se describe en el Ejemplo 1 (La interfaz de contacto a IgG). Los restos que promueven la interacción entre FcR y la inmunoglobulina se muestran en las figuras 7, 10a y 10b. De ese modo, se hacen evidentes tres regiones de interacción (Fig. 5).

1ª región: FcR (restos 85 a 87 y resto 110) – Ig (Cadena A, restos 326–328)

15 La prolina 328 de la Ig está atenazada por los restos Trp 87 y 110 de manera semejante a un sándwich. Estos restos están conservados entre los receptores de IgG e IgE, así como en las IgG e IgE. Un inhibidor que se uniera a esta región prominente interferiría fuertemente con la unión. Esta región es adicionalmente atractiva para el diseño de inhibidores, debido a que se podría emplear la región de superficie hidrófoba expuesta, que comprende los restos Trp 87, Ile 85, Gly 86 de los receptores, para obtener energía de unión adicional. Los grupos funcionales de Thr 113 y las cadenas laterales de Glu 18 y Lys 19 en la vecindad pueden contribuir especialmente a la unión específica de inhibidores.

2ª región: FcR (restos 126–132 y restos 155–158) – Ig (Cadena A y Cadena B, restos 234–239)

25 Los restos 234–239 amino terminales de ambas cadenas de Ig son reconocidos de modo diferente por el FcR, rompiendo de ese modo la doble simetría del fragmento de Fc. Estos restos de la cadena A del fragmento de Fc con restos Val 155 – Lys 158 del receptor, y los mismos restos de la cadena B del fragmento de Fc están en contacto con restos Gly 126 – His 132 del receptor. Esta región muestra las diferencias máximas en el alineamiento de secuencias de los receptores, así como de las inmunoglobulinas, y debería por lo tanto estar implicada en la generación de especificidad. Esta hendidura profunda entre las cadenas del fragmento de Fc es muy adecuada para el diseño de inhibidores, y sería el sitio de elección para el desarrollo de inhibidores cuando están implicados aspectos de especificidad.

30 3ª región: FcR (restos 117, 126 y 129–132) – Ig (Cadena B, restos 264–265 y restos 296–297)

Esta región de unión se caracteriza por un agrupamiento de restos de aminoácidos que poseen grupos funcionales en sus cadenas laterales, que podrían emplearse de diversas maneras para el diseño de inhibidores en el lado del contacto del receptor y de la Ig.

35 Las moléculas que interaccionan con una o más de las regiones descritas anteriormente, y se diseñan o escrutan explícitamente para explotar el conocimiento de los sitios de unión, son consideradas inhibidores según la invención.

40 También se describen composiciones farmacéuticas que contienen, como agente activo, un inhibidor de FcR o un inhibidor de inmunoglobulina como se menciona anteriormente. Tales composiciones farmacéuticas se pueden usar, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades que son debidas a sobre-reacciones o reacciones defectuosas del sistema inmunitario, preferiblemente el tratamiento o prevención de alergias, enfermedades autoinmunitarias o choque anafiláctico.

También se describe el sFcR unido a una fase sólida. Tales receptores heterogéneos se pueden usar para inmunoensayos u otras aplicaciones en las que se puede usar beneficiosamente el receptor en forma inmovilizada.

45 La fase sólida es un material soporte de cromatografía sobre el cual se fija el receptor de Fc, v.g., sefarsosa, sulfato de dextrano, etc. Tales materiales de cromatografía con receptores de Fc unidos a los mismos se pueden usar ventajosamente para la adsorción de inmunoglobulinas de la sangre, plasma o suero de pacientes, o del sobrenadante de cultivo de células productoras de inmunoglobulinas (lo que significa concentración, enriquecimiento y purificación de anticuerpos).

50 Por una parte, los anticuerpos unidos al material de cromatografía se pueden eluir, y, por ejemplo, de ese modo se puede determinar el estado inmunológico de un paciente. Por otra parte, los anticuerpos procedentes de la sangre de un paciente se pueden enriquecer de ese modo antes de llevar a cabo ensayos adicionales. En muchos casos es difícil realizar ensayos de diagnóstico usando muestras de sangre si estas últimas contienen solamente un número muy pequeño de los anticuerpos a identificar. Por medio de una concentración usando una columna cromatográfica específica con receptores de Fc, los anticuerpos de interés se pueden concentrar y separar fácilmente de muchas otras sustancias que podrían alterar el ensayo.

Básicamente, es posible también usar un material de cromatografía en un sistema de perfusión extracorpóreo para lavado de la sangre en caso de ciertas enfermedades en las cuales la eliminación de anticuerpos desempeña un papel crucial.

5 Sin embargo, también es posible usar otro material como fase sólida al cual esté acoplado el receptor de Fc soluble, v.g. placas de microtitulación o pequeñas vasijas de reacción, a cuyas paredes se unen los receptores de Fc directa o indirectamente. Dichas fases sólidas y dichas vasijas pueden ser particularmente importantes para métodos de diagnóstico, dado que permiten el escrutinio usando inmunoensayos, v.g. para detectar la presencia de ciertas inmunoglobulinas en la sangre u otros fluidos corporales de los pacientes.

10 Para resumir, los receptores de Fc $\gamma$  o Fc $\epsilon$  solubles recombinantes, proporcionados por la presente invención, así como la determinación estructural correspondiente de las preparaciones cristalinas de estos receptores, y de complejos cristalinos de receptores e inmunoglobulinas, permiten por primera vez llevar a cabo un diseño racional de fármacos, a partir de los cuales es posible modular la interacción entre las inmunoglobulinas y los receptores de Fc en células o receptores solubles. Tal modulación es preferiblemente una inhibición, por medio de la cual tiene lugar la inhibición de la formación de un complejo de IgG y receptor de Fc cubriendo, y preferiblemente uniendo, moléculas inhibitoras al receptor de Fc o a la inmunoglobulina. Hay diversas aplicaciones médicas para tales fármacos moduladores, y en particular de inhibidores, y sólo se han mencionado de forma ejemplar algunas de estas aplicaciones en el marco de la presente memoria descriptiva. Esto no puede excluir, y no debería excluir, la aplicabilidad de tales moléculas que se han diseñado o identificado en base a los hallazgos sobre la estructura molecular o complejos de FcR/Ig descritos aquí para el tratamiento o prevención de otras perturbaciones de la salud.

20 Los Ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar adicionalmente la invención en asociación con las Figuras.

### Ejemplo 1

shFc $\gamma$ RIIb (Fc $\gamma$ RIIb humano soluble)

#### 1.1 Clonación y Expresión

25 El ADNc de Fc $\gamma$ RIIb2 humano (Engelhardt et al, 1990) se modificó usando PCR mutágena (Dulau et al, 1989). Por lo tanto, se usó un cebador directo para la introducción de una nueva metionina de partida después del sitio de escisión del péptido señal dentro de un sitio *NcoI* (5'–AAT AGA ATT CCA TGG GGA CAC CTG CAG CTC CC–3'), mientras que el cebador inverso introducía un codón de parada entre la parte extracelular putativa y la región transmembránica seguida por un sitio *SalI* (5'–CCC AGT GTC GAC AGC CTA AAT GAT CCC C–3'). El producto de la PCR se digirió con *NcoI* y *SalI*, se clonó a un vector de expresión pET11d (Novagen) y se confirmó la secuencia propuesta. El constructo final se propagó en BL21 (DE3) (Grodberg y Dunn, 1988). Para la sobreexpresión de Fc $\gamma$ RIIb, una sola colonia de las bacterias transformadas se inoculó en 5 ml de medio LB que contenía 100  $\mu$ g de ampicilina por ml (LB–Amp 100), y se incubó toda la noche a 37°C. El cultivo se diluyó 200 veces en LB–Amp 100, y la incubación se continuó hasta que se alcanzó una DO600 de 0,7–0,9. La sobreproducción de la proteína se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de un periodo de crecimiento de 4 horas, las células se cosecharon por centrifugación (30 min, 4000 x g) y se resuspendieron en tampón de tratamiento de ultrasonidos (fosfato de sodio 30 mM, cloruro de sodio 300 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 7,8). Después de añadir 0,1 mg de lisozima por ml de suspensión, e incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se realizó el tratamiento con ultrasonidos (Branson Sonifier, Danbury, CT; Macrotip, potencia 90%, intervalo 80%, 15 min). La suspensión se centrifugó (30 min, 30.000 x g) y se resuspendió con un homogeneizador Dounce en tampón de ultrasonidos que contenía 0,5% de LDAO. La etapa de centrifugación y la resuspensión en tampón que contenía LDAO se repitió una vez más antes de repetir este procedimiento dos veces sin LDAO. Los cuerpos de inclusión purificados se almacenaron a 4°C.

#### 1.2 Replegamiento y purificación de Fc $\gamma$ RIIb humano soluble (shFc $\gamma$ RIIb)

45 Los cuerpos de inclusión purificados se disolvieron hasta una concentración de proteína de 10 mg/ml en cloruro de guanidina 6M, 2–mercaptoetanol 100 mM, y se separaron del material insoluble por centrifugación. El replegamiento se logró por dilución rápida. Por lo tanto, se dejó caer gota a gota 1 ml de la disolución de cuerpos de inclusión bajo agitación en el transcurso de 15 horas en 400 ml del tampón de replegamiento (TRIS/HCl 0,1M, arginina 1,4M, cloruro de sodio 150 mM, GSH 5 mM, GSSG 0,5 mM, PMSF 0,1 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 8,5, 4°C). Después, la mezcla se agitó durante 2–3 días hasta que la concentración de grupos tiol libres se redujo a 1 mM por oxidación al aire, tal como se midió de acuerdo con Ellman (Ellman, 1959). La disolución se dializó frente a PBS, y se filtró en condiciones estériles antes de concentrarla 10 veces en una celda de agitación equipada con una membrana de ultrafiltración MWCO de 3 kD. La disolución de proteínas se aplicó a una columna de sefarosa hlgG (50 mg de hlgG por ml de sefarosa 4B). La proteína no unida se separó por lavado con TRIS 50 mM, pH 8,0, antes de la elución de Fc $\gamma$ RIIb por salto de pH (cloruro de sodio 150 mM, glicina 100 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 3,0). El eluato se neutralizó inmediatamente con TRIS 1M, pH 8,0. La disolución que contenía Fc $\gamma$ RIIb se concentró y se sometió a filtración en gel en una columna Superdex–75 equilibrada con tampón de cristalización (MOPS 2 mM, cloruro de sodio 150 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 7,0). Las fracciones que contenían Fc $\gamma$ RIIb se agruparon, se concentraron hasta 7 mg/ml y se almacenaron a –20°C.



### 1.3 Experimentos de filtración en gel en el equilibrio

Se conectó una columna Superdex 75 a FPLC y se equilibró con PBS que contenía 10  $\mu\text{g}$  de shFcRIIb por ml. El fragmento de Fc humano se disolvió hasta una concentración de 1  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  en el tampón de equilibrio, y se inyectó. El cromatograma resultante produjo un pico positivo que comprendía el complejo del shFc $\gamma$ RIIb y el fragmento de Fc, mientras que el pico negativo representa la falta de receptor consumido por el tampón de ejecución para la formación del complejo.

### 1.4 Cristalización y recogida de datos

Se llevaron a cabo ensayos de cristalización iniciales empleando una pantalla de matriz dispersa de condición 96 (Jancarik y Kim, 1991) en gotas inmóviles a 20°C usando el método de difusión de vapor. Los cristales que se produjeron se mejoraron cambiando el pH así como la concentración de sal, reactivo precipitante y aditivos. Los datos de difracción obtenidos de cristales adecuados se recogieron en un sistema de imágenes en placa (MAR Research) usando radiación CuK $\alpha$  monocromática de grafito a partir de un generador de ánodo rotativo RU200b (Rigaku) que operaba a 50 kV y 100 mA. Las reflexiones se integraron con el programa MOSFLM (Leslie, 1997) y subsiguientemente los datos se escalaron, se redujeron y se truncaron para obtener las amplitudes de estructura-factor usando las rutinas del conjunto de programas CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994).

### 1.5 Sumario de la expresión, purificación y replegamiento de shFc $\gamma$ RIIb

La parte extracelular de Fc $\gamma$ RIIb se expresó a niveles altos bajo el control de un promotor T7 en la cepa BL21/DE3 de *E. coli* positiva a la T7 ARN polimerasa (Grodberg y Dunn, 1988). La proteína se depositó en cuerpos de inclusión, los cuales se emplearon en la primera etapa de purificación. El aislamiento de los cuerpos de inclusión se inició con un procedimiento intenso combinado lisozima/ultrasonidos para abrir virtualmente todas las células que en caso contrario podrían contaminar el producto. Las etapas de lavado subsiguientes con el detergente LDAO, que tiene propiedades excelentes disolviendo impurezas pero no los cuerpos de inclusión propiamente dichos proporcionó ya un producto con una pureza >90% (Fig. 1).

Este producto se utilizó para pruebas de replegamiento sin purificación ulterior. Los cuerpos de inclusión se disolvieron en una concentración alta de 2-mercaptoetanol y guanidina para asegurar el desplazamiento de los agregados covalentes y no covalentes a monómeros. Esta disolución se diluyó rápidamente con tampón de replegamiento para minimizar los contactos entre las moléculas de proteína no plegadas que en caso contrario formarían agregados. El uso de arginina en el tampón de replegamiento impide la modificación irreversible de las cadenas laterales que se reconoce a menudo con urea. Después de la adición de la proteína al tampón de replegamiento, la disolución se agitó a 4°C hasta que la concentración de grupos tiol libres se redujo a 1 mM, lo cual era absolutamente necesario dado que la diálisis precoz daba como resultado un producto inactivo. En una segunda etapa de purificación, el Fc $\gamma$ RIIb dializado y replegado se unió a hIgG inmovilizada para eliminar las fracciones menores de *E. coli* y el receptor inactivo. La proteína se eluyó con un salto de pH y se neutralizó inmediatamente. Después de esta etapa de cromatografía de afinidad, el shFc $\gamma$ RIIb es esencialmente puro a excepción de una pequeña contaminación resultante de la IgG coeluyente que lixivió de la matriz incluso después de uso repetido (Fig. 1). La IgG así como los multímeros receptores que no son visibles en la SDS-PAGE reductora pudieron eliminarse fácilmente por filtración con gel. Paralelamente a la eliminación de los contaminantes en esta etapa, el tampón se cambia cuantitativamente. Este procedimiento asegura una composición definida de la disolución de proteínas dado que incluso ligeras variaciones pueden causar irreproducibilidad de los intentos de cristalización, o incluso inhibir la formación de cristales. Globalmente, se pudieron obtener 6 mg de proteína pura por litro de cultivo de *E. coli*, lo cual es aproximadamente 10% del contenido de Fc $\gamma$ RIIb de los cuerpos de inclusión.

La secuenciación de la proteína N-terminal reveló la identidad con la secuencia esperada H<sub>2</sub>N-GTPAAP sin contaminación detectable. El análisis ESI-MS demostró que el material final usado en las pruebas de cristalización es homogéneo en lo que respecta al tamaño. A partir de la secuencia primaria, se calculó que el peso molecular era 20434 Da, que se corresponde con 20429 Da encontrado por espectroscopia de masas. La discrepancia está dentro del error del instrumento, y no se encuentra ningún pico adicional para una especie que contenga la metionina conductora.

La cristalización de shFc $\gamma$ RIIb se realizó en gotas inmóviles usando el método de difusión de vapor. Las pruebas iniciales con una pantalla de matriz dispersa (Jancarik y Kim, 1991) dieron como resultado ya pequeñas agujas cristalinas. La optimización subsiguiente de la condición de cristalización preliminar variando el precipitante, la sal, su concentración y el pH condujo al aislamiento de tres formas cristalinas diferentes. Crecieron cristales ortorrómbicos a partir de la mezcla de 1,5  $\mu\text{l}$  de disolución del depósito (33% de PEG2000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,4) con 3  $\mu\text{l}$  de la disolución de proteínas. Los cristales aparecieron al cabo de tres días, y alcanzaron su tamaño final de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  x 80  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$  después de una semana. Estos cristales producían difracción a 1,7Å. También se pudieron hacer crecer cristales en otros dos grupos espaciales a partir de la disolución de depósito que contenía 26% de PEG8000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,6, Zn(OAc)<sub>2</sub> 5 mM, cloruro de sodio 100 mM (forma hexagonal) y 26% de PEG8000, NaOAc 0,2M, pH 5,6, 10% (v/v) de 1,4-dioxano, cloruro de sodio 100 mM (forma tetragonal). Estos cristales eran de tamaño adecuado para análisis por rayos X, pero producían difracción únicamente a 2,7Å y 3,8Å para las formas cristalinas tetragonal y hexagonal respectivamente (Tabla 1).

Se expresó Fc $\gamma$ RII en *E. coli*, lo que, además de los costes de producción comparativamente bajos y la disponibilidad, presenta varias ventajas, especialmente cuando la glucosilación llevada a cabo por células de mamífero no es necesaria para la función de la proteína, como en el caso de Fc $\gamma$ RII, en la que la unión de IgG ocurre independientemente de la unión de carbohidratos (Sondermann et al, 1998A). En *E. coli* se puede generar reproduciblemente un producto homogéneo, lo cual está en contraste con la expresión en células de mamífero, en las que se observan a menudo varianzas dependientes de los lotes. En un sistema de este tipo, el producto se expone durante varios días a proteasas a temperaturas superiores a 30°C. Por el contrario, la expresión de la proteína en *E. coli* bajo el control del promotor fuerte T7 a 37°C conduce frecuentemente a la formación de cuerpos de inclusión inaccesibles a las proteasas. Una ventaja adicional de la expresión en bacterias es que el material podía considerarse exento de gérmenes patógenos, que podrían proceder del suero de ternero fetal empleado o de la línea de células propiamente dicha. En la expresión en mamíferos debe tenerse un cuidado particular durante la purificación de la proteína diana, dado que se pueden copurificar hormonas potenciales o factores de crecimiento efectivos. Ya se ha dado a conocer un caso en el que los efectos de sFc $\gamma$ R se adscribieron a una contaminación con TGF $\beta$ 1 (Galon et al, 1995).

#### 1.6 Purificación

El procedimiento de purificación es directo. Se compone de tres etapas que pueden realizarse fácilmente en un solo día. La proteína se obtiene en una forma pura y con altos rendimientos, y podría incluso obtenerse con una calidad considerable sin la costosa columna de afinidad de IgG. El éxito de un protocolo de este tipo dependería de la preparación cuidadosa de los cuerpos de inclusión, dado que la mayoría de las impurezas pueden eliminarse ya en la primera etapa de purificación.

#### 1.7 Caracterización

El Fc $\gamma$ RIIb purificado se caracterizó por SDS-PAGE y enfoque isoeléctrico, así como por secuenciación N-terminal y espectroscopia de masas. Así, el material puede considerarse puro y homogéneo con respecto a su composición química, pero la cuestión intrigante de si el receptor está plegado correctamente sigue sin ser esclarecida. Todas las cisteínas están apareadas, dado que no se detectan grupos tiol libres con el ensayo de Ellman. El material es monomérico, y eluye con el tiempo de retención esperado en picos de forma simétrica a partir de una columna de cromatografía de exclusión de tamaños. Adicionalmente, Fc $\gamma$ RIIb se une a IgG-seferosa, y el Fc $\gamma$ RIIb recombinante de *E. coli* es activo dado que se une específicamente a IgG.

#### 1.8 Cristalización

La forma cristalina ortorrómbica de Fc $\gamma$ RIIb difractó los rayos X a una resolución de 1,7Å, lo cual es una mejora espectacular en comparación con los cristales dados a conocer previamente de la misma molécula derivada de la expresión en células de insecto (Sondermann et al, 1998A). Estos cristales producían difracción a 2,9Å, y eran del grupo espacial P3 $_1$ 21. Así pues, la glucosilación del receptor derivado de células de insecto influye en las condiciones de cristalización. En lugar del grupo espacial trigonal, se encuentran tres formas cristalinas diferentes. Después de una posible resolución de la estructura, estas formas cristalinas contribuirán a identificar las conformaciones artificiales de la proteína debidas a contactos de los cristales.

Los Fc $\gamma$ R no exhiben similitud alguna de secuencia con otras proteínas, pero, debido a una separación conservada de las cisteínas, se afilian a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Por esta razón, se intentó resolver la estructura por reemplazamiento molecular, pero numerosas pruebas en que se usaron dominios de IgG procedentes de una diversidad de moléculas fracasaron. Así pues, la estructura de Fc $\gamma$ RIIb tiene que resolverse por los métodos de reemplazamiento isomórfico múltiple.

Se ha demostrado por primera vez que puede obtenerse Fc $\gamma$ RIIb en una forma activa a partir de *E. coli*. Esto constituye la base para investigaciones cristalográficas que redundarán pronto, debido a los cristales de calidad excepcional ya obtenidos, en la resolución de la estructura de esta importante molécula. La estructura proporcionará información acerca del sitio de unión de IgG, y proporcionará un punto de partida para el diseño, basado en el conocimiento, de fármacos que interfieren con el reconocimiento del ligando por su receptor. Adicionalmente, debido a la gran homología entre Fc $\gamma$ RIIb y otros FcR, incluyendo Fc $\epsilon$ R1a, parece posible que estas moléculas puedan producirse de la misma manera, lo cual podría proporcionar un material valioso para la investigación en curso.

#### 1.9 Métodos

##### Química de la proteína

Se expresó Fc $\gamma$ RIIb humano soluble recombinante en *E. coli*, se replegó, se purificó y se cristalizó como se ha descrito en otro lugar (Sondermann et al, 1988B). Resumidamente, la región extracelular putativa de hFc $\gamma$ RIIb2 (Engelhardt et al, 1990) se sobreexpresó en *E. coli*. Los cuerpos de inclusión se purificaron por tratamiento de las células con lisozima, y tratamiento con ultrasonidos subsiguiente. La suspensión resultante se centrifugó (30 min a 30.000 x g) y se lavó con tampón que contenía 0,5% de LDAO. La etapa de centrifugación y la resuspensión en tampón que contenía LDAO se repitió una vez más antes de repetir este procedimiento dos veces sin LDAO. Los

cuerpos de inclusión se resolvieron en hidrócloruro de guanidina 6M, y la proteína se renaturalizó como se ha descrito. La disolución de proteína dializada y filtrada se aplicó a una columna de hlgG sefarosa, y se eluyó por un salto de pH. Las fracciones neutralizadas concentradas se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Superdex-75 (26/60, Pharmacia).

## 5 Cristalización

La cristalización se realizó en gotas inmóviles a 20°C usando la técnica de difusión de vapor. Los escrutinios de cristalización se realizaron cambiando el pH, sal, precipitante y aditivos. Los cristales finales usados para la recogida de datos se dejaron crecer en 33% de PEG2000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,4 (forma ortorrómbica), 26% de PEG8000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,6, 10% (v/v) de 1,4-dioxano, cloruro de sodio 100 mM (forma tetragonal), y 26% de PEG8000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,6, Zn(OAc)<sub>2</sub> 5 mM, cloruro de sodio 100 mM (forma hexagonal). La proteína derivada de células de insecto se cristalizó en 32% de PEG6000, acetato de sodio 0,2M, pH 5,3.

### Preparación de derivados de átomos pesados

Los derivados de átomos pesados se prepararon empapando los cristales en el tampón de cristalización que contenía cloruro de (2,2'-6,2"-terpiridinio)platino(II) 2 mM durante 24 horas, o cloruro de uranilo 10 mM durante 8 días.

### Recogida de datos de rayos X

Los datos de difracción se recogieron en un sistema de imágenes en placa (MAR Research) usando radiación CuK<sub>α</sub> monocromática de grafito a partir de un generador de ánodo rotativo RU200b (Rigaku) que operaba a 50 kV y 100 mA. Las reflexiones se integraron con el programa MOSFLM 5.50 (Leslie, 1997), y subsiguientemente los datos se escalaron y truncan para obtener las amplitudes de estructura-factor usando las rutinas del conjunto de programas CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994).

### Determinación de la estructura

La estructura se resolvió con los procedimientos estándar del método MIR. Del gran número de remojos realizados con componentes de átomos pesados diferentes, solamente los dos compuestos produjeron mapas de Patterson interpretables. Las posiciones de los átomos pesados para cada derivado se determinaron a partir de los mapas de Patterson diferenciales, y se calcularon las fases iniciales. Se usaron mapas de Fourier diferenciales de fases cruzadas para confirmar las posiciones de los átomos pesados y establecer un origen común para los derivados. Se incluyeron datos anómalos para discriminar entre los enantiómeros. Los parámetros de los átomos pesados se refinaron ulteriormente con el programa MLPHARE procedente del paquete CCP4, lo que condujo a las estadísticas recopiladas en la Tabla 2. Se calculó un mapa de densidad electrónica hasta una resolución de 2,1Å, y las fases se mejoraron ulteriormente por aplanamiento con disolvente y apareamiento de histogramas con el programa DM del conjunto CCP4. El mapa de densidad electrónica resultante era de calidad suficiente para disponer la mayor parte de los restos de aminoácidos. La construcción del modelo se realizó con O (Jones et al, 1991) en una estación de trabajo Indigo2 (Silicon Graphics Incorporation). El refinamiento de la estructura se realizó con XPLOR (Brünger et al, 1987) aumentando gradualmente la resolución hasta 1,7Å usando el conjunto de parámetros de Engh y Huber (Eng y Huber, 1991). Cuando la estructura estuvo completa después de varias tandas de construcción del modelo y refinamiento de los factores B de restricción individuales ( $R_{\text{fac}} = 29\%/R_{\text{libre}} = 36\%$ ), se incorporaron 150 moléculas de agua en la densidad electrónica cuando un mapa de Fo-Fc contorneado a 3,5  $\sigma$  coincidió con la densidad electrónica bien definida de un mapa de 2Fo-Fc contorneado a 1  $\sigma$ . La estadística de refinamiento resultante se muestra en la Tabla 3.

#### 1.10 Determinación de la estructura

La estructura cristalina del Fc $\gamma$ R1Ib humano soluble recombinante se resolvió por reemplazamiento isomórfico múltiple (MIR) hasta resolución de 1,7Å, dado que una resolución de la estructura por reemplazamiento molecular con dominios aislados del fragmento de Fc de la IgG1 humana (Huber et al, 1996, entrada PDB 1fc1; Deisenhofer, 1981) fracasaba. La parte extracelular putativa del receptor (restos de aminoácidos 1-187 como se representan en SEC ID NO: 2) se utilizó para pruebas de cristalización (Sondermann et al, 1998B), mientras que el modelo contiene los restos 5-176, dado que los términos son flexibles y no atribuibles a la densidad electrónica. Adicionalmente, el modelo contiene 150 moléculas de agua, y las estadísticas de refinamiento se resumen en la Tabla 2. La estructura contiene una prolina cis en la posición 11. Ninguno de los ángulos de torsión de la cadena principal está localizado en regiones rechazadas del gráfico de Ramachandran. Se utilizó el modelo totalmente refinado para resolver la estructura de la misma proteína en cristales del grupo espacial P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2 y de la forma glucosilada derivada de células de insecto en cristales del grupo espacial P3<sub>1</sub>21 (Tabla 2).

La cadena polipeptídica de Fc $\gamma$ R1Ib se pliega en dos dominios semejantes a Ig como era de esperar por su afiliación dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Cada dominio se compone de dos láminas beta que están dispuestas en un sándwich, conectando el puente de disulfuro conservado las hebras B y F en las láminas opuestas (Fig. 3). Tres hebras  $\beta$  anti-paralelas (A1, B, E) se oponen a una láminas de cinco hebras  $\beta$  (C', C, F, G, A2), con lo

cual la cadena A1 abandona la lámina  $\beta$  de tres hebras y sufre cruzamiento con la láminas anti-paralela de cuatro hebras, añadiendo la quinta hebra paralela corta A2. La disposición de los elementos de la estructura secundaria, así como su conectividad, es idéntica en ambos dominios del Fc $\gamma$ R1Ib, y un ajuste de cuerpo rígido de un dominio sobre el otro reveló una distancia r.m.s. de 1,29Å de 67 átomos C $\alpha$  coincidentes.

5 Los dominios están dispuestos de modo casi perpendicular entre sí, encerrando un ángulo de 70 grados entre sus ejes largos, que forman una estructura global acorazonada. Esta disposición da como resultado una región de contacto extensa entre los dominios (Fig. 4). Los restos de la cadena A2 y del segmento que enlaza A2 y A1 del dominio N-terminal están entrelazados con los restos de las cadenas A1 y B del dominio C-terminal. Esta región está fuertemente compactada, y la interacción se ve reforzada por varios enlaces de hidrógeno, dando como resultado una disposición rígida. Esto se confirma por la conservación de la estructura en tres grupos espaciales diferentes. En las formas cristalinas ortorrómbica, tetragonal y hexagonal (derivadas de células de insecto) se encuentra una desviación menor que 2° en el ángulo entre dominios.

### 1.11 Estructuras globales

15 La estructura del Fc $\gamma$ R1Ib humano recombinante derivado de *E. coli* se resolvió por MIR hasta 1,7Å de resolución a partir de cristales ortorrómbicos. Se encuentra una estructura esencialmente idéntica en cristales tetragonales y, con proteína derivada de células de insecto, en cristales hexagonales. En las tres estructuras, los últimos nueve restos de la cadena del polipéptido se encontraron desordenados. La flexibilidad de la región enlazadora C-terminal entre el núcleo estructurado de la molécula y la parte transmembránica puede ser funcionalmente importante para permitir alguna reorientación del receptor a fin de mejorar el reconocimiento de las partes de Fc en los inmunocomplejos.

### 20 1.12 Receptores homólogos

Los dominios de Ig encontrados en la superfamilia de proteínas de Ig se caracterizan por una estructura en sándwich beta, conectando un puente disulfuro conservado dos hebras de las láminas opuestas. La disposición típica de las hebras beta anti-paralelas 3 y 4 que forman un sándwich como el encontrado en Fc $\gamma$ R1Ib ocurre también en el receptor de las células T, fragmento de Fc, CD4 o el fragmento de Fab. Una alineación estructural de los dominios de Ig individuales de estas moléculas con los dos dominios de Fc $\gamma$ R1Ib muestra una estructura común, estrechamente relacionada. Sin embargo, la disposición relativa de los dominios no está relacionada en estas moléculas, y abarca un amplio sector. A pesar de la similitud estructural entre los dominios de Ig de diferentes moléculas y la desviación r.m.s. sorprendentemente baja de los átomos C $\alpha$  que resultan cuando se superponen los dos dominios de Fc $\gamma$ R1I, no se encuentra ninguna similitud significativa de secuencias (Figs. 5a y 5b). Una alineación de secuencias basada en la estructura muestra un patrón de hidrofobia conservado a lo largo de la secuencia de los dominios, junto con, además de las cisteínas, solo pocos restos de aminoácidos idénticos. Se preparó primeramente una alineación basada en la estructura de los dos dominios C-terminales de la cadena pesada de IgG1 y el Fc $\gamma$ R1Ib, y se añadieron las secuencias de los otros dominios de Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R1a relacionados. Esto demuestra que las secuencias de los tres dominios Fc $\gamma$ R1 y los receptores de los dos dominios son compatibles con el patrón de hidrofobia de los dominios de Ig y se revelan varios restos de aminoácidos conservados. Primeramente, los diferentes dominios de un FcR están más relacionados entre sí que a los dominios de Ig de otras moléculas de la superfamilia de Ig. En segundo lugar, los dominios N-terminales de los receptores están relacionados entre sí como lo hacen los segundos dominios. En tercer lugar, la secuencia del tercer dominio de Fc $\gamma$ R1 muestra características de ambos grupos de dominios. Considerados en su conjunto, se confirma la afiliación de los FcR en la superfamilia de Ig y se especula que todos los dominios de FcR proceden de un ancestro común, un antiguo receptor de un solo dominio que adquirió un segundo dominio por duplicación génica. El desarrollo divergente ulterior de un receptor de dos dominios de este tipo dio como resultado la actual diversidad, incluyendo Fc $\gamma$ R1, que adquirió un tercer dominio.

La conservación de estos restos de aminoácidos que contribuyen al contacto entre dominios en Fc $\gamma$ R1Ib en la alineación es un indicio de una disposición de dominios similar en diferentes receptores. En la Tabla 4, los restos que contribuyen con sus cadenas laterales al contacto entre dominios (Fig. 4) están recopilados para Fc $\gamma$ R1Ib, junto con los restos de aminoácidos correspondientes en otros receptores de acuerdo con la alineación de secuencias basada en estructuras de Fig. 5b. Excepto para Asn15, que no está conservado entre los FcR, los restos implicados son idénticos o están reemplazados de modo conservativo, proporcionando un fuerte respaldo para una estructura y disposición de dominios similar en todos los FcR.

### 50 1.13 La interfaz de contacto a IgG

Una información limitada acerca de las interacciones de FcR con sus ligandos está disponible a partir de estudios de mutagénesis (Hogarth et al, 1992; Hulett et al, 1994; Hulett et al, 1995). Intercambiando sistemáticamente bucles entre las hebras  $\beta$  de Fc $\gamma$ R1Ia para los restos de aminoácidos de Fc $\epsilon$ R1a, se evaluaron los bucles B/C, C'/E y F/G del dominio C-terminal como importantes para la unión de ligandos (Fig. 3, Fig. 5b). En el modelo de estructura, estos bucles son adyacentes y están libremente accesibles al ligando potencial. Adicionalmente, la mayoría de los restos de aminoácidos en estos bucles se intercambiaron por alaninas por mutaciones de un solo sitio que dieron como resultado una alteración drástica de la afinidad de Fc $\gamma$ R1Ia por la IgG1 humana dímera. Asimismo, el intercambio de un solo aminoácido Arg 131 a His en el dominio C-terminal (bucle C'/E) en el polimorfismo respondedor

5 alto/respondedor bajo, que altera la afinidad del Fc $\gamma$ RIIa por IgG1 murina, apunta a dicha región. Así, los restos de aminoácidos en esta área son importantes para la unión de ligandos o para la integridad estructural de esa región. En este caso, la estructura muestra un agrupamiento de los restos de aminoácidos hidrófobos Pro 114, Leu 115 y Val 116 en la vecindad de Tyr 157. Este parche está separado de la región Leu 159, Phe 121 y Phe 129 por los restos de aminoácidos cargados positivamente Arg 131 y Lys 117 que sobresalen de la estructura central (Fig. 5b).

#### 1.14 Glucosilación

10 En la secuencia de Fc $\gamma$ RIIb, se encuentran tres sitios de N–glucosilación potenciales. Los tres sitios se encuentran en la superficie de la molécula, y son accesibles. Están localizados en los bucles E/F (N61 y N142) de ambos dominios y en la hebra E (N 135) del dominio C–terminal (Fig. 3, Fig. 6). Dado que el material usado para la resolución de esta estructura se obtuvo a partir de *E. coli*, no contiene carbohidratos, mientras que los FcR aislados de células de mamífero están altamente glucosilados. Los tres sitios de glucosilación potenciales están localizados bastante lejos de la región de unión de IgG putativa, y el Fc $\gamma$ RIIb humano no glucosilado se une a IgG humana, lo que sugiere un papel menor de la glucosilación en la unión. Esto fue confirmado por la estructura del Fc $\gamma$ RIIb producido en células de insecto que está glucosilado (Sondermann et al, 1998A). Excepto por un cambio de 2° del ángulo de interdominio debido posiblemente a contactos con cristales diferentes, no se encontraron diferencias entre las estructuras de la proteína glucosilada y no glucosilada. Los tres sitios de glucosilación se usan sólo opcionalmente como se demuestra por SDS–PAGE, en el que el material aparece en cuatro bandas. No se encontró densidad electrónica adicional alguna para dichos azúcares como consecuencia de la heterogeneidad química y estructural.

#### 20 **Ejemplo 2 (Ejemplo Comparativo)**

shFc $\gamma$ RIIA (Fc $\gamma$ RIIA humano soluble)

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto en lo que se refiere a los cambios que se indican:

##### 2.1 Clonación y Expresión

25 Se generó shFc $\gamma$ RIIA mutando el ADNc de tipo salvaje respectivo (Stengelin et al, 1988) y se expresó de acuerdo con el Ejemplo 1 con los cebadores mutágenos enumerados en la Tabla 5. Para la expresión de la proteína se seleccionó un vector pTT22b +.

##### 2.2 Replegamiento y purificación

30 Se replegó shFc $\gamma$ RIIA de acuerdo con el Ejemplo 1 con el tampón de replegamiento respectivo que se indica en la Tabla 6.

##### 2.3 Cristalización

Se cristalizó shFc $\gamma$ RIIA como se describe en las condiciones indicadas en la Tabla 7.

##### 2.4 Determinación de la estructura

La estructura se resolvió con el método de reemplazamiento isomorfo, con shFc $\gamma$ RIIb como modelo de investigación.

#### 35 **Ejemplo 3**

shFc $\gamma$ RIII (Fc $\gamma$ RIII humano soluble)

El procedimiento se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto en lo que respecta a los cambios que se indican:

##### 3.1 Clonación y Expresión

40 Se generó shFc $\gamma$ RIII mutando el ADNc de tipo salvaje respectivo (Simmons y Seed, 1988), y se expresó de acuerdo con el Ejemplo 1 con los cebadores mutágenos enumerados en la Tabla 5. Para la expresión de la proteína se seleccionó un vector pET22b +.

##### 3.2 Replegamiento y purificación

Se replegó shFc $\gamma$ RIII de acuerdo con el Ejemplo 1 con el tampón de replegamiento respectivo enumerado en la Tabla 6.

##### 45 3.3 Cristalización

Se cristalizó shFc $\gamma$ RIII como se describe en las condiciones indicadas en la Tabla 7.

### 3.4 Determinación de la estructura

La estructura se resolvió con el método de reemplazamiento isomorfo, con shFc $\gamma$ RIIIb como modelo de investigación.

### 3.5 Cristalización de un complejo de shFc $\gamma$ RIII:hFc1

5 Se utilizó hIgG1 derivada del suero de un paciente con mieloma para preparar fragmentos de Fc (hFc1) por digestión con plasmina (Deisenhofer et al, 1976). Los fragmentos de Fc resultantes se separaron de los fragmentos de Fab por cromatografía con proteína A. La hIgG parcialmente digerida se separó por cromatografía de exclusión de tamaños con MBS (MOPS 2 mM, NaCl 150 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 7,0) como tampón de ejecución. Cantidades equimolares de hFc1 y shFc $\gamma$ RIII se mezclaron y se diluyeron con MBS hasta una concentración de 10 mg/ml. El complejo se cristalizó como se describe en las condiciones indicadas en la Tabla 5.

## 10 Ejemplo 4

shFc $\epsilon$ RII (Fc $\epsilon$ RII humano soluble)

El procedimiento se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto por lo que respecta a los cambios que se indican:

### 4.1 Clonación y Expresión

15 Se generó Fc $\epsilon$ RII mutando el ADNc de tipo salvaje respectivo (Kikutani et al, 1986), y se expresó de acuerdo con el Ejemplo 2 con los cebadores mutágenos enumerados en la Tabla 5. Para la expresión de la proteína se seleccionó un vector pET23a +.

### 4.2 Replegamiento y purificación

20 El replegamiento de shFc $\epsilon$ RII se logró como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que, antes de una dilución rápida, los cuerpos de inclusión disueltos se dializaron frente a cloruro de guanidina 6M, acetato de sodio 20 mM, pH 4,0. Se replegó shFc $\epsilon$ RII de acuerdo con el Ejemplo 1 con el tampón de replegamiento respectivo indicado en la Tabla 6. Después del replegamiento, la disolución de proteína se dializó frente a PBS, se concentró 100 veces, y se purificó por cromatografía de filtración con gel sobre Superdex 75. Esto proporcionó shFc $\epsilon$ RII puro, que se dializó frente a TRIS/HCl 2 mM, NaCl 150 mM, azida sodio al 0,02%, pH 8,0, se concentró hasta 10 mg/ml y se almacenó a 4°C.

## 25 Ejemplo 5

shFc $\gamma$ RI (Fc $\gamma$ RI humano soluble)

El procedimiento se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto en lo que respecta a los cambios que se indican:

### 5.1 Clonación y Expresión

30 Se generó shFc $\gamma$ RI mutando el ADNc de tipo salvaje respectivo (Allen y Seed, 1988), y se expresó de acuerdo con el Ejemplo 1 con los cebadores mutágenos enumerados en la Tabla 5. Para la expresión de la proteína se seleccionó un vector pET32a +, que contiene después de la tiorredoxina N-terminal un marcador de hexahistidina con un sitio C-terminal de escisión por trombina, seguido del shFc $\gamma$ RI en marco con las proteínas y restos de aminoácidos mencionados. Para la sobreexpresión de la proteína de fusión, se usó la cepa BL21 (DE3) de E. coli que contenía los plásmidos pUBS y pLysS (Novagen).

35 Los cuerpos de inclusión purificados se solubilizaron en guanidina-HCl 6M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, TRIS 50 mM, pH 8,0, y se unieron a una columna Ni-NTA (Qiagen). La elución se realizó con un gradiente de imidazol que variaba desde imidazol 0M a imidazol 1M. La proteína eluida se dializó frente a un volumen mil veces mayor de NaCl 150 mM, TRIS 50 mM pH 8,0, GSH 2 mM, GSSG 0,5 mM durante 24 horas a 4°C. Después de concentrar la disolución de proteínas hasta 25% del volumen inicial, se añadió trombina. Después de 6 h de incubación a 37°C, la tiorredoxina N-terminal y el marcador de His se eliminaron por completo como se comprobó por secuenciación N-terminal. Durante esta digestión, el shFc $\gamma$ RI precipitó cuantitativamente de la disolución.

### 40 5.2 Replegamiento y purificación

Se replegó shFc $\gamma$ RI de acuerdo con el Ejemplo 1 con el tampón de replegamiento respectivo indicado en la Tabla 6. Después de que el potencial redox disminuyó hasta 1 mM, la disolución se dializó frente a PBS pH 8,0, y se concentró.

La proteína replegada se analizó por cromatografía de exclusión de tamaños, que produjo un pico del receptor monomérico propuesto, y SDS-PAGE no reductora, que mostró una banda principal a 30 kDa.

**Ejemplo 6**

shFc $\epsilon$ R1a (Fc $\epsilon$ R1a humano soluble)

El procedimiento se realizó de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto en lo que respecta a los cambios que se indican:

## 6.1 Clonación y Expresión

- 5 Se generó shFc $\epsilon$ RI mutando el ADNc respectivo de tipo salvaje (Kochan et al, 1988), y se expresó de acuerdo con el Ejemplo 1 con los cebadores mutágenos enumerados en la Tabla 5. Para la expresión de la proteína se seleccionó un vector pET23a +.

Breve descripción de las Figuras

Fig. 1: SDS–PAGE reductora al 15% que muestra la purificación de sFc $\gamma$ R1Ib

- 10 Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: Lisado de *E. coli* antes de la inducción. Línea 3: Lisado de *E. coli* 1 h después de la inducción. Línea 4: Lisado de *E. coli* 4 h después de la inducción. Línea 5: Cuerpos de inclusión purificados de sFc $\gamma$ R1Ib. Línea 6: Eluato de la columna de afinidad de hlgG. Línea 7: Fracciones agrupadas de la columna de filtración con gel.

Fig. 2: Filtración en gel en el equilibrio

- 15 Se aplicó 1  $\mu$ g de hFc disuelto en 10  $\mu$ l de tampón de equilibrado (10  $\mu$ g de sFc $\gamma$ R1Ib/ml de PBS) a una columna de cromatografía de exclusión de tamaños, y se midió la absorbancia del efluente (280 nm) en función del tiempo. El fragmento de Fc inyectado forma un complejo con el sFc $\gamma$ R1Ib en el tampón de equilibrado ( $t = 22$  min). El pico negativo de sFc $\gamma$ R1Ib consumido se observa a  $t = 26$  min.

Fig. 3: Estructura global del sFc $\gamma$ R1Ib humano

- 20 Representación en cinta estereográfica de la estructura de sFc $\gamma$ R1Ib. Los bucles supuestos importantes para la unión de IgG se representan en rojo con algo de los restos dentro del sitio de unión y el puente disulfuro conservado en representación de punto y raya. Los sitios de N–glucosilación potenciales se muestran como bolas verdes. Los términos están marcados, y las hebras  $\beta$  se numeran consecutivamente para el dominio N–terminal en negro, y para el dominio C–terminal en azul. La figura se creó usando los programas MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) y RENDER (Merritt y Murphy, 1994).
- 25

Fig. 4: Contactos entre dominios

- La figura muestra un primer plano en los restos implicados en los contactos entre dominios de sFc $\gamma$ R1Ib. Los restos de aminoácidos del dominio N–terminal se representan en azul, y los restos del dominio C–terminal en amarillo. El modelo está cubierto por una densidad electrónica de 2Fo–Fc contorneada a  $1 \sigma$  obtenida a partir de las coordenadas finales. Los puentes de hidrógeno entre los dominios se representan por líneas blancas. La figura se creó usando el programa MAIN (Turk, 1992).
- 30

Fig. 5a: Superposición de los dos dominios de Fc $\gamma$ R1Ib y el dominio CH2 de IgG1 humana

- Se superpusieron ambos dominios de Fc $\gamma$ R1Ib y el dominio CH2 de hlgG1. El dominio N–terminal se representa en azul, el dominio C–terminal en rojo, y el dominio CH2 de hlgG1 en verde. Los términos respectivos están marcados, y los puentes disulfuro conservados se representan como líneas delgadas.
- 35

Fig. 5b: Alineación de secuencias basada en la estructura de los dominios de sFc $\gamma$ R1Ib con dominios de otros miembros de la familia de FcR

- La parte superior de la figura muestra el alineamiento de secuencias basado en la estructura de los dominios de Fc $\gamma$ R1Ib y del fragmento de Fc de hlgG1 realizado con el programa GBF–3D–FIT (Lessel y Schomburg, 1994). Los restos de aminoácidos con una distancia  $C\alpha$  menor que 2,0Å en los dominios superpuestos están enmascarados: lila para los restos coincidentes entre los dominios del fragmento de Fc; amarillo para los restos en los dominios de Fc $\gamma$ R1Ib; y verde cuando se pueden superponer en los cuatro dominios. Las hebras  $\beta$  se indican bajo esta parte del alineamiento, y están marcadas consistentemente con la Figura 3.
- 40

- La parte inferior de la figura muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los otros Fc $\gamma$ R y el Fc $\epsilon$ R1a homólogo para el perfil dado en la parte superior de la figura usando rutinas del paquete GCG (Genetics Computer Group, 1994). Las filas superior e inferior de la numeración se refieren a los dominios N– y C–terminales de Fc $\gamma$ R1Ib. Las cisteínas conservadas están impresas en color magenta, y los sitios potenciales de glucosilación en azul. Los restos idénticos dentro del primer dominio están enmarcados en color naranja, los que se encuentran en el segundo dominio en color rosado, y verde cuando los restos se conservan en ambos dominios. El tercer dominio menos conservado de Fc $\gamma$ R1 está alineado entre los dominios primero y segundo. Las flechas rojas apuntan a los restos que
- 50

están implicados en contactos de cadenas laterales entre el dominio primero y el segundo, mientras que las flechas azules representan restos que son relevantes para la unión de IgG. La figura se produjo con el programa ALSCRIPT (Barton, 1993).

Fig. 6: Los sitios de unión putativos de Fc $\gamma$ RIIb

- 5 Representaciones en superficie sólida de Fc $\gamma$ RIIb tal como se produjeron con GRASP (Nicholls et al, 1991); la codificación de colores está de acuerdo con el potencial de superficie relativo desde negativo (rojo) a positivo (azul). La Fig. 6a muestra la molécula como en Fig. 3 por una rotación de aproximadamente 90° en sentido contrario a las agujas del reloj alrededor de la vertical. En Fig. 6b, la molécula se ha hecho girar 90° en el sentido de las agujas del reloj alrededor del mismo eje. Ambas vistas muestran las regiones de unión putativas en el dominio C-terminal (Fig. 6a) y N-terminal (Fig. 6b). Los restos de aminoácidos expuestos en el texto están marcados.
- 10

Fig. 7: Traza de C $\alpha$  de las estructuras superpuestas de los receptores de Fc $\gamma$

Fc $\gamma$ RIII rojo, Fc $\gamma$ RIIa verde y Fc $\gamma$ RIIb azul. Los restos importantes para la unión de IgG se muestran en punto y raya. Los términos N y C están marcados.

Fig. 8: Vista de conjunto de la estructura cristalina de Fc $\gamma$ RIII/fragmento de Fc en representación de cinta

- 15 Los restos de azúcar unidos al fragmento de Fc se indican en punto y raya. El Fc $\gamma$ RIII (azul) se une en la región bisagra inferior entre la cadena B (roja) y la cadena A (verde) del fragmento de Fc.

Fig. 9: Primer plano en la región de unión del Fc $\gamma$ RIII y el fragmento de Fc

El esquema de colores está de acuerdo con la figura 8, y los restos importantes para la formación de los complejos se muestran en punto y raya.

- 20 Fig. 10a:

En la parte superior de la figura 10a se muestra un alineamiento de secuencias basada en la estructura de los ectodominios del receptor de Fc. Los restos conservados están sombreados en amarillo, y los restos idénticos en color anaranjado. La parte inferior de la figura muestra una parte del alineamiento de las secuencias de anticuerpos humanos. Los restos del Fc $\gamma$ RIII humano en contacto con el fragmento de Fc en la estructura cristalina de los complejos están conectados por líneas (negras para la interacción hidrófoba, rojas para los puentes salinos, y azules para los puentes de hidrógeno). Los restos del receptor de Fc en contacto con la cadena A del fragmento de Fc están conectados con líneas de trazos, y los que están en contacto con la cadena B del fragmento de Fc con líneas continuas. Las líneas rojas, azules y negras representan contactos cargados, polares y de otros tipos, respectivamente.

- 30 Fig. 10b:

En la parte superior de la figura 10b se muestra un alineamiento de secuencias basada en la estructura de los ectodominios del receptor de Fc. Los restos conservados están sombreados en amarillo, y los restos idénticos en color anaranjado. Los restos conservados dentro de las secuencias menos relacionadas Kir y del receptor de FcA están sombreados en azul. La parte inferior de la figura muestra una parte del alineamiento de anticuerpos humanos con la secuencia de IgE de ratón (mIgE). Los restos del Fc $\gamma$ RIII humano en contacto con el fragmento de Fc en la estructura cristalina de los complejos están conectados por líneas (negras para la interacción hidrófoba, rojas para los puentes salinos, y azules para los enlaces de hidrógeno). Los restos del receptor de Fc en contacto con la cadena A del fragmento de Fc están conectados por líneas de trazos, y los que están en contacto con la cadena B del fragmento de Fc con líneas continuas. Las líneas rojas, azules y negras representan contactos cargados, polares y de otros tipos, respectivamente.

35

40

Fig. 11 y Fig. 12:

La Fig. 11 y la Fig. 12 muestran un alineamiento del sFc $\gamma$ R, sFc $\epsilon$ R1a y la forma corta de sFc $\epsilon$ RII producidos, y los sFc $\gamma$ R y sFc $\epsilon$ R1a producidos sin sFc $\epsilon$ RII, respectivamente.

Tabla 1: Resultados cristalográficos

- 45 En esta Tabla se muestran los datos cristalográficos preliminares obtenidos



	Ortorrónico	Tetragonal	Hexagonal
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> [19]	P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 [94]	P3 [143]
Dimensiones de la celdilla unitaria	a=40,8Å, b=50,9Å, c=80,5Å, α=90°, β=90°, γ=90°	a=85,7Å, b=85,7Å, c=63,4Å, α=90°, β=90°, γ=90°	a=80,9Å, b=80,9Å, c=157,0Å, α=90°, β=90°, γ=90°
R <sub>fusión</sub>	5,8%	9,8%	13,6%
Resolución	1,7 Å	21,87Å	3,8Å
Único	18.040	6.616	7.210
Finalización	89,1%	97,1%	63,0%
Multiplicidad	3,5	4,4	1,3
V <sub>M</sub> , moléculas por unidad asimétrica, contenido de disolvente	2,0Å <sup>3</sup> /Da, 1 mol, 41% disolvente	2,91Å <sup>3</sup> /Da, 1 mol, 58% disolvente	2,97Å <sup>3</sup> /Da, 5 moles, 59% disolvente

Tabla 2: Estadísticas de recogida de datos

Derivado	Grupo espacial	No. de reflexiones únicas	Multiplicidad	Resolución (Å)	Finalización (global/envoltura última) (%/%)	R <sub>m</sub> (%)	Nº de sitios	Potencia de puesta en fase
NATI	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	18009	3,6	1,74	92,9/86,4	5,5		
NATI	P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2	6615	4,5	2,70	97,1/94,3	10,1		
NATI–Baculo	P3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	3545	2,5	3,0	93,0/98,9	14,4		
UOAc	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	7722	4,2	2,1	96,8/95,7	7,3	1	1,79
PtPy	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	5520	3,9	2,3	89,7/49,6	10,5	1	1,39

$$R_m = \sum |I_h - \langle I_h \rangle| / \sum \langle I_h \rangle$$

- 5 Potencia de puesta en fase:  $\langle F_H \rangle / E$ , en la que  $\langle F_H \rangle = \sum (F_H^2 / n)^{1/2}$  es la amplitud de estructura de los átomos pesados por r.m.s.

$E = \sum [(F_{PHC} - F_{PH})^2 / n]^{1/2}$  es el error residual de falta de cierre, siendo  $F_{PH}$  la amplitud del factor de estructura y  $F_{PHC} = |F_P + F_H|$  la amplitud calculada del factor de estructura del derivado.

Tabla 3: Estadísticas de refinamiento

Intervalo de resolución (Å)	8,0–1,74Å
No. de reflexiones únicas ( $F > O\sigma(F)$ )	16252
Factor R	19,4
R <sub>libre</sub> *	27,9
No. de átomos por unidad asimétrica	
proteína	1371
disolvente	150

Desviación $R_{ms}$ de la geometría ideal	
longitud de enlace (Å)	0,009
ángulo de enlace (°)	2,007
Factores B medios (Å <sup>2</sup> )	
cadena principal de proteína	18,8
cadena lateral de proteína	25,2
disolvente	36,7
Desviación $R_{ms}$ de los factores B enlazados (Å <sup>2</sup> )	4,1

\*  $R_{libre}$ : Se utilizaron 5% de las reflexiones como conjunto de datos de referencia y no se incluyeron en el refinamiento.

Tabla 4: Restos que contribuyen al contacto entre dominios vía cadenas laterales

Fc $\gamma$ RIIb	Fc $\gamma$ RIIa	Fc $\gamma$ RIII	Fc $\gamma$ RI	Fc $\epsilon$ RIa
Asn15	Asn	Ser	Ser	Arg
Asp20	Asp	Asp	Glu	Glu
Gln91	Gln	Gln	Gln	Gln
His108	His	His	His	His
Trp110	Trp	Trp	Trp	Trp

5 Tabla 5: Cebadores usados para la amplificación de los FcR

Constructo	Cebador de 5'	Cebador de 3'
sFc $\gamma$ RI	5'-CACCCATATGGCAGTGATCTCTTT-3'	5'-AGGACTCGAGACTAGACAGGAGTTGGTAAC-3'
sFc $\gamma$ RIIa	5'-ACAGTCATATGGCAGCTCCCC-3'	5'-AAAAAAGCTTCAGGGCACTTGGAC-3'
sFc $\gamma$ RIIb	5'-AATTCCATGGGGACACCTGCAGCTCCC-3'	5'-CCCAGTGTCGACAGCCTAAATGATCCCC-3'
sFc $\gamma$ RIII	5'-AAAAAACATATGCGGACTGAAG-3'	5'-AAAAAAGCTTAACCTTGAGTGATG-3'
sFc $\epsilon$ RIa	5'-GATGGCCATATGGCAGTCCCTCAG-3'	5'-CAATGGATCCTAAAATTGTAGCCAG-3'
sFc $\epsilon$ RII	5'-AAAAAACATATGGAGTTGCAGG-3'	5'-TGGCTGGATCCATGCrCAAG-3'

Los sitios de restricción introducidos están subrayados; los codones de partida y de parada están escritos en negrilla-cursiva.

Tabla 6: Condiciones de repliegamiento para los FcR

Constructo	Tampón
sFc $\gamma$ RI	TRIS/HCl 0,1M, arginina 1,2M, NaCl 150 mM, GSH 5 mM, GSSG 0,5 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 8,0
sFc $\gamma$ RIIa	TRIS/HCl 0,1M, arginina 1,4M, NaCl 150 mM, GSH 2 mM, GSSG 0,5 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 8,0
sFc $\gamma$ RIIb	TRIS/HCl 0,1M, arginina 1,4M, NaCl 150 mM, GSH 5 mM, GSSG 0,5 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 8,0

sFc $\gamma$ RIII	TRIS/HCl 0,1M, arginina 1,0M, NaCl 150 mM, GSH 2 mM, GSSG 0,5 mM, azida de sodio al 0,02%, pH 8,0
sFc $\epsilon$ RII	TRIS/HCl 0,1M, arginina 0,8M, NaCl 150 mM, GSH 5 mM, GSSG 0,5 mM, azida del sodio al 0,02%, pH 8,3

Tabla 7: Condiciones de cristalización para los FcR

Constructo	Condición	Grupo espacial, constantes de celda	Resolución
sFc $\gamma$ RIIa	26% de PEG8000, acetato de sodio 0,2M/ácido acético pH 4,6, azida de sodio al 0,02%	C2, a=80,4Å, b=49,7Å, c=54,6Å, a=g=90°, b=128,1°	3,0Å
sFc $\gamma$ RIIb	33% de PEG2000, acetato de sodio 0,2M, azida de sodio al 0,02%, pH 5,4	P212121, a=40,8Å, b=50,9Å, c=80,5Å, a=b=g=90°	1,7Å
sFc $\gamma$ RIII	22% de PEG8000, MES/TRIS 0,1M pH 7,8, azida de sodio al 0,02%	P22121, a=36,7Å, b=60,3Å, c=85,6Å, a=b=g=90°	2,5Å
sFc $\gamma$ RIII: hFc1	6% de PEG8000, MES/TRIS 0,1M pH 5,6, tartrato de Na/K 0,2M, azida de sodio al 0,02%	P6522, a=b=115,0Å, c=303,3Å, a=b=90°, g=120°	3,3Å
sFc $\gamma$ RIII	22% de PEG8000, MES/TRIS 0,1M pH 7,8, azida de sodio al 0,02%	P22121, a=36,7Å, b=60,3Å, c=85,6Å, a=b=g=90°	2,5Å

## Referencias

- 5 Ades, E.W., Phillips, D.J., Shore, S.L., Gordon, D.S., LaVia, M.F., Black, C.M., Reimer, C.B. (1976). Analysis of mononuclear cell surfaces with fluoresceinated Staphylococcal protein A complexed with IgG antibody or heat-aggregated  $\gamma$ -globulin, *J. Immunol.* 117,21 19.
- Allen J.M., Seed B.; "Nucleotide sequence of three cDNAs for the human high affinity Fc receptor (FcRI)"; *Nucleic Acids Res.* 16:11824–11824(1988).
- 10 Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., Fridman, W.H. (1992). Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808–1812.
- Barton, G.C. (1993), ALSCRIPT: tool to format multiple sequence alignments, *Prot. Eng.* 6, 37–40.
- Bazil, V. y Strominger, J.L. (1994), Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of GD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes, *J. Immunol.* 152, 1314–1322.
- 15 Brünger, A.T., Kuriyan, J., Karplus, M. (1987), Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics, *Science* 35, 458–460.
- Burmeister, W.P., Huber, A.H., Bjorkman, P.J. (1994), Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 372, 379–383.
- 20 Ceuppens, J.L., Baroja, M.L., van Vaeck, F., Anderson, C.L. (1988), Defect in the membrane expression of high affinity 72kD Fc $\gamma$  receptors on phagocytic cells in four healthy subjects, *J. Clin. Invest* 82, 571–578.
- Collaborative computational project, Number 4 (1994), The CCP4 suite: Programs for protein crystallography, *Acta crystallogr.* D50, 760–763.
- 25 Deisenhofer, J., Jones, T.A., Huber, R., Sjodahl, J., Sjoquist, J. (1978), Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus*, *Z. Phys. Chem.* 359, 975–985.
- Deisenhofer, J. (1981), Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9– and 2.8Å resolution, *Biochemistry* 20, 2361–2370.

- Deisenhofer J., Colman P.M., Huber R., Haupt H., Schwick G.; "Crystallographic structural studies of a human Fc-fragment. I. An electron-density map at 4Å resolution and a partial model"; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 435-445(1976).
- Dulau, L, Cheyrou, A., Aigle, M. (1989), Directed mutagenesis using PCR, *Nucleic Acids Res.* 17, 2873.
- 5 Ellman (1959), Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 79-77.
- Engelhardt, W., Geerds, C., Frey, J. (1990), Distribution, inducibility and biological function of the cloned and expressed human  $\beta$ Fc receptor II, *Eur. J. Immunol.* 20, 1367-1377.
- Engh, R.A. y Huber, R. (1991), Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement, *Acta crystallogr.* A47, 392-400.
- 10 Fleit, H.B., Kobasiuk, C.D., Daly, C., Furie, R., Levy, P.C., Webster, R.O. (1992), A soluble form of Fc $\gamma$ RIII is present in human serum and other body fluids and is elevated at sites of inflammation, *Blood* 79, 2721 -2728.
- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.-L., Sautès, C. (1992), Structural bases of Fc $\gamma$  receptor functions, *Immunol. Rev.* 125, 49-76.
- Fridman, W.H., Teillaud, J.-L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C., Sautès, C. 15 (1993). Soluble Fc $\gamma$  receptors, *J. Leukocyte Biol.* 54, 504-512.
- Gabb, H.A., Jackson, R.M., Sternberg, M.J.E. (1997), Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information, *J. Mol. Biol.* 272, 106-120.
- Galon, J., Bouchard, C., Fridman, W.H., Sautès, C. (1995), Ligands and biological activities of soluble Fc $\gamma$  receptors, *Immunol. Lett.* 44, 175-181.
- 20 Genetics Computer Group (1994), Program Manual for the Wisconsin Package Version 8, Madison, Wisconsin.
- Gordon, J. et al., (1980), The molecules controlling B lymphocytes. *Immunol. Today*, 8: 339-344.
- Grodberg, J, y Dunn, J.J. (1988), OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification, *J. Bacteriol.* 170, 1245-1253.
- Hogarth, P.M., Hulett, M.D., Ierino, F.L., Tate, B., Powell, M.S., Brinkworth, R.I. (1992), Identification of the immunoglobulin binding regions (IBR) of Fc $\gamma$ RII and Fc $\epsilon$ RI, *Immunol. Rev.* 125, 21-35.
- 25 Homsy, J., Meyer, M., Tateno, M., Clarkson, S., Levy, J.A. (1989), The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells, *Science* 244, 1357-1360.
- Hoover, R.G., Lary, C., Page, R., Travis, P., Owens, R., Flick, J., Kornbluth, J., Barlogie, B. (1995), Autoregulatory circuits in myeloma: Tumor cell cytotoxicity mediated by soluble CD16, *J. Clin. Invest.* 95, 241-247.
- 30 Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M. and Palm, W. (1976), Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment, *Nature* 264, 415-420.
- Hulett, M.D., Witort, E., Brinkworth, R.I., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M. (1994). Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc $\gamma$ RII, *J. Biol. Chem.* 269, 15287-15293.
- Hulett, M.D., Witort, E., Brinkworth, R.I., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M. (1895), Multiple regions of human Fc $\gamma$ RII (CD32) contribute to the binding of IgG, *J. Biol. Chem.* 270, 21 188-21194.
- 35 Ierino, F.L, Powell, M.S., McKenzie, I.F.C., Hogarth, P.M. (1993), Recombinant soluble human Fc $\gamma$ RII: Production, characterization, and inhibition of the arthus reaction, *J. Exp. Med.* 178, 1617-1628.
- Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991), Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409-411.
- 40 Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M. (1991), Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta crystallogr.* A47, 110-119.
- Kikutani H., Inui S., Sato R., Barsumian E.L., Owaki H., Yamasaki K., Kaisho T. Uchibayashi N., Hardy R.R., Hirano T., Tsunasawa S., Sakiyama F., Suernura M., Kishimoto T.; "Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E"; *Cell* 47(5):657-665(1986).
- 45 Khayat, D., Soubrane. C., Andriew, J.M., Visonneau, S., Erne, D., Tourani, J.M., Beldjord, K., Weil, M., Fernández, E., Jaquillat, C. (1980), Changes of soluble CD16 levels in serum of HIV patients: Correlation with clinical and biological prognostic factors, *J. Infect. Dis.* 161, 430-435.

- Kochan J., Pettine L.F., Hakimi J., Kishi K., Kinet J.P.; "Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor"; *Nucleic Acids Res.* 16:3584–3584 (1988).
- Simmons D., Seed B.; "The Fc-gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein"; *Nature* 333:568–570(1988).
- 5 Kraulis, P.J. (1991), MOLSCRIPT; a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 24, 946–950.
- Leslie, A.G.W. (1997), *Mosflm user guide*, mosflm version 5.50, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK.
- Lessel, U. and Schomburg, D. (1994), Similarities between protein 3-D structures, *Protein Eng.* 7, 1175–1187.
- 10 Littaua, R., Kurane, I. and Ennis, F.A. (1990), Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection, *J. Immunol.* 144, 3183–3186.
- Lynch, R.G., Hagen, M., Mueller, A., Sandor, M. (1995), Potential role of Fc $\gamma$ R in early development of murine lymphoid cells: Evidence for functional interaction between Fc $\gamma$ R on pre-thymocytes and an alternative, non-Ig ligand on thymic stromal cells, *Immunol. Lett.* 44, 105–109.
- 15 Mathiot, C., Teillaud, J.L., Elmalek, M., Mosseri, L., Euler-Ziegler, L., Daragon, A., Grosbois, B., Michaux, J.L., Facon, T., Bernard, J.F., Duclos, B., Monconduit, M., Fridman, W.H. (1983), Correlation between serum soluble CD16 (sCD16) levels and disease stage in patients with multiple myeloma, *J. Clin. Immunol.* 13, 41–48.
- Merritt, E.A. and Murphy, M.E.P. (1994), Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst. D50*, 869–873.
- 20 Metzger, H. (1992A), Transmembrane signaling: The joy of aggregation, *J. Immunol.* 149, 1477–1487.
- Metzger, H. (1992B), The receptor with high affinity for IgE, *Immunol. Rev.* 125, 37–48.
- Müller, S. y Hoover, R.G. (1985), T cells with Fc receptors in myeloma; suppression of growth and secretion of MOPC-315 by T alpha cells, *J. Immunol.* 134, 644–7.
- Nicholls, A., Sharp, K.A., Honig, B. (1991), Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11, 281–296.
- 25 Poo, H., Kraus, J.C., Mayo-Bond, L., Todd, R.F., Petty, H.R.(1995), Interaction of Fc $\gamma$  receptor IIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants; evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies, *J. Mol. Biol.* 247, 597–603.
- Rappaport, E.F., Cassel, D.L., Walterhouse, D.O., McKenzie, S.E., Surrey, S.; Keller, M.A., Schreiber, A.D., Schwartz, E. (1993), A soluble form of the human Fc receptor Fc $\gamma$ RIIIa: cloning, transcript analysis and detection. *Exp. Hematol.* 21, 689–696.
- 30 Ravanel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V., Rabourdincombe, C. (1997), Measles virus nucleocapsid protein binds to Fc $\gamma$ RII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* 186, 269–278.
- Roman, S., Moore, J.S., Darby, C., Muller, S., Hoover, R.G. (1988), Modulation of Ig gene expression by Ig binding factors. Suppression of alpha-H chain and lambda-2-L chain mRNA accumulation in MOPC-315 by IgA-binding factor, *J. Immunology* 140, 3622–30.
- 35 Sarfat, D. et al., (1988), Elevation of IgE-binding factors of serum in patients with B-cell derived chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 71: 94–98.
- Sauer-Eriksson, A.E., Kieywegt, G.J., Uhlen, M., Jones, T.A. (1995), Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG, *Structure* 3, 265–78.
- 40 Small, T., et al., (1990), B-cell differentiation following autologous, conventional or T-cell depleted bone marrow transplantation: a recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood*, 76: 1647–1656.
- Sondermann, P., Huber, R., Jacob, U. (1998B), Preparation and crystallization of active soluble human Fc $\gamma$ RIIb derived from E.coli, Protein Structure, presentado.
- 45 Sondermann, P., Kutscher, C., Jacob, U., Frey, J. (1998A), Characterization and crystallization of soluble human Fc $\gamma$  receptor II isoforms produced in insect cells, Biochemistry, presentado.

Sondermann, P., Kutscher, C., Jacob, U., Frey, J., Analysis of complexes of IgG and soluble human Fc $\gamma$ -Receptor II produced in insect cells and its crystallization, presentado.

Stengelin S., Stamenkovic I., Seed B.; "Isolation of cDNAs for two distinct human Fc receptors by ligand affinity cloning"; EMBO J. 7:1053-1059(1988).

5 Tax, W.J.M., Willems, H.W., Reekers, P.P.M., Capel, P.J.A., Koene, R.A.P. (1983), Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells, Nature 304, 445-447.

Teillaud, J.L., Brunati, S., Elmalek, M., Aster, A., Nicaise, P., Moncuit, J., Mathiot, C., Job-Deslandre, G., Fridman, W.H. (1990), Involvement of FcR+ T cells and of IgG-BF in the control of myeloma cells. Mol. Immunol. 27, 1209-17.

Turk, D. (1992), Tesis doctoral, TU München, Alemania.

10 Ulvestad, E., Matre, R., Tonder, O. (1988), IgG Fc receptors in sera from patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus, Scand. J. Rheumatol., Suppl. 75, 203-208.

van de Winkel, J.G.J. y Capel, P.J.A. (1993), Human IgG Fc receptor heterogeneity: Molecular aspects and clinical implications. Immunol. Today 14, 215-221.

15 Varin, N., Sautés, C., Galinha, A., Even, J., Hogarth, P.M., Fridman, W.H. (1989). Recombinant soluble receptors for the Fc $\gamma$  portion inhibit antibody production in vitro, Eur. J. Immunol. 19, 2263-2268.

Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R.F., Nabel, E.G., Sánchez, A., Nabel, G.J. (1998), Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins, Science 279, 983-984.

20 Zhou, M.-J., Todd R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R. (1993), Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc $\gamma$  receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions, J. Immunol. 150, 3030-3041.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissensc

25 <120> Receptores de Fc solubles recombinantes

<130> FcR soluble recombinante 19290PWO

<140> PCT/EP/99/09440

30 <141> 1999-12-03

<150> EP98122969.3

<151> 1998-12-03

35 <160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

40 <211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

5

Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile Ser His Asn Gly  
 130 135 140  
 Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro Val Leu Asn Ala  
 165 170 175  
 Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val Thr Leu Ser Cys  
 180 185 190  
 Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu Tyr Phe Ser  
 195 200 205  
 Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn Thr Ser Ser Glu  
 210 215 220  
 Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Trp Cys  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro Val  
 260 265

<210> 2

<211> 174

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2



Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp Ile  
 1 5 10 15

Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala Arg  
 20 25 30

Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile  
 35 40 45

Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp  
 50 55 60

Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro  
 65 70 75 80

Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His  
 85 90 95

Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp  
 100 105 110

Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser  
 115 120 125

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn  
 130 135 140

His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr  
 145 150 155 160

Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro  
 165 170

<210> 3

<211> 185

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro  
 1 5 10 15

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg  
 20 25 30

Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly  
 35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn  
 50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu  
 65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln  
 85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys  
 100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn  
 115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro  
 130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile  
 145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala  
 165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile  
 180 185

<210> 4

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln  
 1 5 10 15

Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly  
 20 25 30

Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser  
 35 40 45

Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val  
 50 55 60

Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser  
 65 70 75 80

Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala  
 85 90 95

Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His  
 100 105 110

Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly  
 115 120 125

Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys  
 130 135 140

Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly  
 145 150 155 160

Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly  
 165 170 175

<210> 5

<211> 183

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

<211> 275

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asp Thr Thr Gln Ser Leu Lys Gln Leu Glu Glu Arg Ala Ala Arg  
 1 5 10 15

Asn Val Ser Gln Val Ser Lys Asn Leu Glu Ser His His Gly Asp Gln  
 20 25 30

Met Thr Gln Lys Ser Gln Ser Thr Gln Ile Ser Gln Glu Leu Glu Glu  
 35 40 45

Leu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ser Gln Asp Leu Glu Leu Ser  
 50 55 60

Trp Asn Leu Asn Gly Leu Gln Ala Asp Leu Ser Ser Phe Lys Ser Gln  
 65 70 75 80

Glu Leu Asn Glu Arg Asn Glu Ala Ser Asp Leu Leu Glu Arg Leu Arg  
 85 90 95

Glu Glu Val Thr Lys Leu Arg Met Glu Leu Gln Val Ser Ser Gly Phe  
 100 105 110

Val Cys Asn Thr Cys Pro Glu Lys Trp Ile Asn Phe Gln Arg Lys Cys  
 115 120 125

Tyr Tyr Phe Gly Lys Gly Thr Lys Gln Trp Val His Ala Arg Tyr Ala  
 130 135 140

Cys Asp Asp Met Glu Gly Gln Leu Val Ser Ile His Ser Pro Glu Glu  
 145 150 155 160

Gln Asp Phe Leu Thr Lys His Ala Ser His Thr Gly Ser Trp Ile Gly  
 165 170 175

Leu Arg Asn Leu Asp Leu Lys Gly Glu Phe Ile Trp Val Asp Gly Ser  
 180 185 190

His Val Asp Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Thr Ser Arg Ser  
 195 200 205

Gln Gly Glu Asp Cys Val Met Met Arg Gly Ser Gly Arg Trp Asn Asp  
 210 215 220

Ala Phe Cys Asp Arg Lys Leu Gly Ala Trp Val Cys Asp Arg Leu Ala  
 225 230 235 240

Thr Cys Thr Pro Pro Ala Ser Glu Gly Ser Ala Glu Ser Met Gly Pro  
 245 250 255

Asp Ser Arg Pro Asp Pro Asp Gly Arg Leu Pro Thr Pro Ser Ala Pro  
 260 265 270

Leu His Ser  
 275

<210> 7

<211> 820

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

catatggcag t gatctcttt gcagcctcca tgggtcagcg tgttccaaga ggaaccgta 60
accttgcaact gtgaggtgct ccatctgcct gggagcagct ctacacagtg gtttctcaat 120
ggcacagcca ctacagacct gacccccagc tacagaatca cctctgccag tgtcaatgac 180
agtggatgaat acaggtgccg gagaggtctc tcagggcgaa gtgaccccat acagctggaa 240
atccacagag gctggctact actgcaggtc tccagcagag tcttcacgga aggagaacct 300
ctggccttga ggtgtcatgc gtggaaggat aagctggtgt acaatgtgct ttactatcga 360
aatggcaaag cctttaagtt tttccactgg aattctaacc tcaccattct gaaaaccaac 420
ataagtcaca atggcaccta ccattgctca ggcattggaa agcatcgcta cacatcagca 480
ggaatatctg tcaactgtgaa agagctatit ccagctccag tgctgaatgc atctgtgaca 540
tccccactcc tggaggggaa tctggtcacc ctgagctgtg aaacaaagtt gctcttgag 600
aggcctggtt tgcagcttta cttctccttc tacatgggca gcaagaccct gcgaggcagg 660
aacacatcct ctgaatacca aatactaact gctagaagag aagactctgg gttatactgg 720
tgcgaggctg ccacagagga tggaaatgtc cttaagcgca gccctgagtt ggagcttcaa 780
gtgcttggcc tccagttacc aactcctgtc tagtctcgag 820
    
```

10

<210> 8

<211> 533

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

>atatggcag ctccccaaa ggctgtgctg aaacttgagc ccccgaggat caacgtgctc 60
>aggaggact ctgtgactct gacatgccag ggggctcgca gccctgagag cgactccatt 120
>agtggttcc acaatgggaa tctcattccc acccacacgc agcccagcta caggttcaag 180
>ccaacaaca atgacagcgg ggagtacacg tgccagactg gccagaccag cctcagcgcac 240
>ctgtgcate tgactgtgct ttccgaatgg ctgggtgctc agaccctca cctggagttc 300
>aggagggag aaaccatcat gctgaggtgc cacagctgga aggacaagcc tctggtcaag 360
>tcacattct tccagaatgg aaaatcccag aaattctccc gtttgatcc caccttctcc 420
>tcccacaag caaccacag tcacagtggg gattaccact gcacaggaaa cataggctac 480
>acgtgttct catccaagcc tgtgaccatc actgtccaag tgccctgaag ctt          533
    
```

5

<210> 9

<211> 569

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

ccatggggac acctgcagct ccccaaagg ctgtgctgaa actcgagccc cagtggatca 60
acgtgctcca ggaggactct gtgactctga catgccgggg gactcacagc cctgagagcg 120
actccattca gtggttccac aatgggaatc tcattcccac ccacacgcag cccagctaca 180
ggttcaaggc caacaacaat gacagcgggg agtacacgtg ccagactggc cagaccagcc 240
tcagcgacc tgtgcatctg actgtgcttt ctgagtggct ggtgctccag acccctcacc 300
tgaggtcca ggaggagaa accatcgtgc tgaggtgcca cagctggaag gacaagcctc 360
tggtcaaggt cacattcttc cagaatggaa aatccaagaa attttcccgt tcggatccca 420
acttctccat cccacaagca aaccacagtc acagtgggta ttaccactgc acaggaaca 480
taggctacac gctgtactca tccaagcctg tgaccatcac tgtccaagct cccagctctt 540
caccgatggg gatcatttag gctgtcgac          569
    
```

15 <210> 10

<211> 538

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 10

```

catatgcgga ctgaagatct cccaaaggct gtggtgttcc tggagcctca atggtacagc 60
gtgcttgaga aggacagtgt gactctgaag tgccagggag cctactcccc tgaggacaat 120
tccacacagt ggtttcacaa tgagagcctc atctcaagcc aggcctcgag ctacttcatt 180
gacgctgcca cagtcaacga cagtggagag tacaggtgcc agacaaacct ctccaccctc 240
agtgacccgg tgcagctaga agtccatata ggctggctgt tgctccaggc ccctcgggtg 300
gtgttcaagg aggaagacc tttcacctg aggtgtcaca gctggaagaa cactgctctg 360
cataaggcca catatttaca gaatggcaaa gacaggaagt attttcatca taattctgac 420
ttccacattc caaaagccac actcaaagat agcggctcct acttctgcag ggggcttgtt 480
gggagtaaaa atgtgtcttc agagactgtg aacatcacca tcaactcaagg ttaagctt 538

```

<210> 11

<211> 560

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

catatggcag tccctcagaa acctaaggct tccttgaacc ctccatggaa tagaatattt 60
aaaggagaga atgtgactct tacatgtaat gggacaatt tctttgaagt cagttccacc 120
aaatggttcc acaatggcag cctttcagaa gagacaaatt caagtttgaa tattgtgaat 180
gccaaatttg aagacagtgg agaatacaaa tgtcagcacc aacaagttaa tgagagtga 240
cctgtgtacc tggaggtctt cagtgactgg ctgctcctc aggcctctgc tgaggtggtg 300
atggagggcc agcccctctt cctcaggtgc catggttggg ggaactggga tgtgtacaag 360
gtgatctatt ataaggatgg tgaagctctc aagtactggt atgagaacca caacatctcc 420
attacaaatg ccacagttga agacagtgga acctactact gtacgggcaa agtgtggcag 480
ctggactatg agtctgagcc cctcaacatt actgtaataa aagctccgcg tgagaagtac 540
tggctacaat tttaggatcc 560

```

10

<210> 12

<211> 532

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 12



catatggagt tgcagggtgc cagcggcttt gtgtgcaaca cgtgccctga aaagtggatc 60  
 aatttccaac ggaagtgcta ctacttcggc aagggcacca agcagtgggt ccacgcccgg 120  
 tatgcctgtg acgacatgga agggcagctg gtcagcatcc acagcccgga ggagcaggac 180  
 ttctgacca agcatgccag ccacaccggc tcctggattg gccttcggaa cttggacctg 240  
 aagggggagt ttatctgggt ggatgggagc cacgtggact acagcaactg ggctccaggg 300  
 gagcccacca gccggagcca gggcgaggac tgcgtgatga tgcggggctc cggctcgctgg 360  
 aacgacgcct tctgcgaccg taagctgggc gcctgggtgt gcgaccggct ggccacatgc 420  
 acgcccag ccagcgaagg ttccgcggag tccatgggac ctgattcaag accagaccct 480  
 gacggccgcc tgcccacccc ctctgccct ctccactctt gagcatggat cc 532

<210> 13

<211> 1419

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

ggctgtgact gctgtgctct gggcgccact cgctccaggg agtgatggga atcctgtcat 60  
 ttttacctgt ccttgccact gagagtgact gggctgactg caagtcccc cagccttggg 120  
 gtcatatgct tctgtggaca gctgtgctat tcttggtcc tgttgctggg acacctgcag 180  
 ctccccaaa ggctgtgctg aaactcgagc ccagtggtat caactgtctc caggaggact 240  
 ctgtgactct gacatgccgg gggactcaca gccctgagag cgactccatt cagtggttcc 300

acaatgggaa tctcattccc acccacacgc agcccagcta caggttcaag gccacaaca 360  
 atgacagcgg ggagtacacg tgccagactg gccagaccag cctcagcgac cctgtgcatc 420  
 tgacagtgct ttctgagtgg ctggtgctcc agaccctca cctggagttc caggagggag 480  
 aaaccatcgt gctgaggtgc cacagctgga aggacaagcc tctggtaag gtcacattct 540  
 tccagaatgg aaaatccaag aaattttccc gttcggatcc caacttctcc atcccacaag 600  
 caaaccacag tcacagtggg gattaccatt gcacaggaaa cataggctac acgctgtact 660  
 catccaagcc tgtgaccatc actgtccaag ctcccagctc ttcaccgatg gggatcattg 720  
 tggctgtggg cactgggatt gctgtagctg ccattgttgc tgctgtagtg gccttgatct 780  
 actgcaggaa aaagcggatt tcagccaatc cactaatcc tgatgaggct gacaaagttg 840  
 gggctgagaa cacaatcacc tattcacttc tcatgcacc ggatgctctg gaagagcctg 900  
 atgaccagaa ccgtatttag tctccattgt cttgcattgg gatttgagaa gaaatcagag 960  
 agggaagatc tggatattcc tggcctaaat tccccttggg gaggacaggg agatgctgca 1020  
 gttccaaaag agaaggttcc ttccagagtc atctacctga gtccctgaagc tccctgtcct 1080  
 gaaagccaca gacaatatgg tcccaaatgc ccgactgcac cttctgtgct tcagctcttc 1140  
 ttgacatcaa ggctcttccg ttccacatcc acacagccaa tccaattaat caaaccactg 1200  
 ttattaacag ataatagcaa cttgggaaat gcttatgta caggttacgt gagaacaatc 1260  
 atgtaaatct atatgatctc agaaatgta aaatagacta acctctacca gcacattaa 1320  
 agtgattgtt tctgggtgat aaaattattg atgattttta ttttctttat ttttctataa 1380  
 agatcatata ttacttttat aataaaacat tataaaaac 1419

10

<210> 14

<211> 1068

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

agatctcagc acagtaagca ccaggagtcc atgaagaaga tggctcctgc catggaatcc 60
cctactctac tgtgtgtagc cttactgttc ttcgctccag atggcgtggt agcagtcctt 120
cagaaacctt aggtctcctt gaacctcca tggaaataga tatttaaagg agagaatgtg 180
actcttacat gtaatgggaa caatttcttt gaagtcagtt ccaccaaatg gttccacaat 240
ggcagccttt cagaagagac aaattcaagt ttgaatattg tgaatgccaa atttgaagac 300
agtggagaat acaaatgtca gcaccaacaa gttaatgaga gtgaacctgt gtacctggaa 360
gtcttcagtg actggctgct ccttcaggcc tctgctgagg tggatgagg gggccagccc 420
ctcttcctca ggtgccatgg ttggaggaac tgggatgtgt acaaggtgat ctattataag 480
gatggtgaag ctctcaagta ctggtatgag aaccacaaca tctccattac aaatgccaca 540
gttgaagaca gtggaacctt ctactgtacg ggcaaagtgt ggcagctgga ctatgagtct 600
gagcccctca acattactgt aataaaagct ccgctgaga agtactggct acaatttttt 660
atcccattgt tgggtggtgat tctgtttgct gtggacacag gattatttat ctcaactcag 720
cagcaggtca catttctctt gaagattaag agaaccagga aaggcttcag acttctgaac 780
ccacatccta agccaaacct caaaaacaac tgatataatt aactcaagaa atatttgcaa 840
cattagtttt tttccagcat cagcaattgc tactcaattg tcaaacacag cttgcaatat 900
acatagaaac gtctgtgctc aaggatttat agaaatgctt cattaactg agtgaaactg 960
attaagtggc atgtaatagt aagtgtcaa ttaacattgg ttgaataaat gagagaatga 1020
atagattcat ttattagcat ttgtaaaaga gatgttcaat ttagatct 1068

```

5

<210> 15

<211> 1321

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 15

gacagatttc actgctccca ccagcttggg gacaacatgt ggttcttgac aactctgctc 60  
ctttgggttc cagttgatgg gcaagtggac accacaaagg cagtgatctc tttgcagcct 120  
ccatgggtca gcgtgttcca agaggaaacc gtaaccttgc actgtgaggt gctccatctg 180  
cctgggagca gctctacaca gtggtttctc aatggcacag ccaactcagac ctcgaccccc 240  
agctacagaa tcacctctgc cagtgtcaat gacagtggg aatacaggtg ccagagaggt 300  
ctctcagggc gaagtgaccc catacagctg gaaatccaca gaggctggct actactgcag 360  
gtctccagca gagtcttcac ggaaggagaa cctctggcct tgaggtgtca tgcgtggaag 420  
gataagctgg tgtacaatgt gctttactat cgaaatggca aagcctttaa gtttttccac 480  
tggaaattcta acctacccat tctgaaaacc aacataagtc acaatggcac ctaccattgc 540  
tcaggcatgg gaaagcatcg ctacacatca gcaggaatat ctgtcactgt gaaagagcta 600  
tttccagctc cagtgtgaa tgcattctgt acatccccac tcctggaggg gaatctggct 660  
accctgagct gtgaaacaaa gttgctctg cagaggcctg gtttgagct ttaacttctc 720  
ttctacatgg gcagcaagac cctgcgaggc aggaacacat cctctgaata ccaataacta 780  
actgctagaa gagaagactc tgggttatac tgggtcgagg ctgccacaga ggatggaaat 840  
gtccttaagc gcagccctga gttggagctt caagtgcttg gcctccagtt accaactcct 900  
gtctggtttc atgtccttt ctatctggca gtgggaataa tgtttttagt gaactgtt 960  
ctctgggtga caatacgtaa agaactgaaa agaaagaaaa agtgggattt agaaatctct 1020  
ttggattctg gtcatgagaa gaaggtaact tccagccttc aagaagacag acatttagaa 1080  
gaagagctga aatgtcagga acaaaaagaa gaacagctgc aggaaggggt gcaccggaag 1140  
gagccccagg gggccacgta gcagcggctc agtgggtggc catcgatctg gaccgtcccc 1200  
tgcccacttg ctccccgtga gcaactgcga caaacatcca aaagttcaac aacaccagaa 1260  
ctgtgtgtct catggtatgt aactcttaaa gcaataaat gaactgactt caaaaaaaaa 1320  
a

<210> 16

<211> 2359

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

cccaaattgc tcagaatgta tgtcccagaa acctgtggct gcttcaacca ttgacagttt 60  
tgctgctgct ggcttctgca gacagtcaag ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac 120  
ttgagccccc gtggatcaac gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccaggggg 180  
ctcgagccc tgagagcgac tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attccccacc 240  
acacgcagcc cagctacaggttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc 300  
agactggcca gaccagcctc agcgaccctg tgcatctgac tgtgctttcc gaatggctgg 360  
tgctccagac ccctcacctg gagtccagg agggagaaac catcatgctg aggtgccaca 420  
gctggaagga caagcctctg gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaa tcccagaaat 480  
tctcccgttt ggatcccc ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt 540  
accactgcac aggaaacata ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg accatcactg 600  
tccaagtgcc cagcatgggc agctcttcac caatggggat cattgtggct gtggctattg 660  
cgactgctgt agcagccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc aggaaaaaag 720

```

ggatttcagc caattccact gatcctgtga aggctgcccc atttgagcca cctggacgtc 780
aatgattgc catcagaaag agacaacttg aagaaaccaa caatgactat gaaacagctg 840
acggcgggcta catgactctg aaccccaggg cacctactga cgatgataaa aacatctacc 900
tgactettcc tcccaacgac catgtcaaca gtaataacta aagagtaacg ttatgccatg 960
tggtcatact ctcagcttgc tgatggatga caaaaagagg ggaattgta aaggaaaatt 1020
taaatggaga ctggaaaaat cctgagcaaa caaaaccacc tggcccttag aaatagcttt 1080
aactttgctt aaactacaaa cacaagcaaa acttcacggg gtcatactac atacaagcat 1140
aagcaaaaact taacttggat ctttctgtgt aaatgcttat gttagaata agacaacccc 1200
agccaatcac aagcagccta ctaacatata attaggtgac tagggacttt ctaagaagat 1260
acctaccccc aaaaaacaat tatgtaattg aaaaccaacc gattgccttt attttgcttc 1320
cacattttcc caataaatac ttgcctgtga ctttttgcca ctggaacact aaacttcatg 1380
aattgocgct cagatttttc ctttaacatc tttttttttt ttgacagagt ctcaatctgt 1440
taccagggct ggagtgcagt ggtgctatct tggctcactg caaacccgcc tcccagggtt 1500
aagcgattct tatgcctcag cctcccagta gctgggatta gaggcattgt ccatcatacc 1560
cagctaattt ttgtattttt tttttttat ttttagtaga gacaggggtt cgcaatggtg 1620
gccaggccga tctcgaactt ctggcctcta gcgatctgcc cgctcggcc tcccaaagtg 1680
ctgggatgac cgcatcagcc ccaatgtcca gcctctttaa catcttcttt cctatgcctt 1740
ctctgtggat cctactgct ggtttctgcc ttctccatgc tgagaacaaa atcacctatt 1800
cactgcttat gcagtcggaa gctccagaag aacaaagagc ccaattacca gaaccacatt 1860
aagtctccat tgttttgctt tgggatttga gaagagaatt agagaggtga ggatctggtg 1920
tttctggac taaattccct tggggaagac gaagggatgc tgcagttcca aaagagaagg 1980
actcttccag agtcatctac ctgagtccca aagctccctg tcctgaaagc cacagacaat 2040
atggtcccaa atgactgact gcacettctg tgcctcagcc gttcttgaca tcaagaatct 2100
tctgttccac atccacacag ccaatacaat tagtcaaacc actgttatta acagatgtag 2160
caacatgaga aacgcttatg ttacaggtta catgagagca atcatgtaag tctatatgac 2220
ttcagaaatg ttaaaataga ctaacctcta acaacaaatt aaaagtgatt gtttcaagg 2280
gatgcaatta ttgatgacct attttatttt tctataatga tcatatatta cctttgtaat 2340
aaaacattat aaccaaaac
2359

```

<210> 17

<211> 887

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

tctttggtga cttgtccact ccagtgtggc atcatgtggc agctgctcct cccaactgct 60  
 ctgetacttc tagtttcagc tggcatgctg actgaagatc tcccaaagge tgtggtgttc 120  
 ctggagcctc satggtacag cgtgetttag aaggacagtg tgactctgaa gtgccagggg 180  
 gcctactccc ctgaggacaa ttccacacag tggtttcaca atgagagcct catctcaagc 240  
 caggcctcga gctacttcat tgacgctgcc acagtcaacg acagtggaga gtacaggtgc 300  
 cagacaaacc tctccaccct cagtgaccgg gtgcagctag aagtccatat cggctggctg 360  
 ttgctccagg cccctcgggtg ggtgttcaag gaggaagacc ctattcacct gaggtgtcac 420  
 agctggaaga acaactgctct gcataaggte acatatttac agaatggcaa agacaggaag 480  
 tattttcatc ataattctga cttccacatt ccaaaagcca cactcaaaga tagcggtcc 540  
 tactttctga gggggcttgt tgggagtaaa aatgtgtctt cagagactgt gaacatcacc 600  
 atcactcaag gtttggcagt gtcaaccatc tcatcattct ctccacctgg gtaccaagtc 660  
 tctttctgct tggatgatgt actccttttt gcagtggaca caggactata tttctctgtg 720

aagacaaaca tttgaagctc aacaagagac tggaaggacc ataaacttaa atggagaaag 780  
 gaccctcaag acaaatgacc cccatcccat gggagtaata agagcagtgg cagcagcatc 840  
 tctgaacatt tctctggatt tgcaacceca tcatctcag gcctctc 887

<210> 18

<211> 1503

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

ctcctgctta aacctctgtc tctgacggtc cctgccaatc gctctggtcg accccaacac 60  
actaggagga cagacacagg ctccaaactc cactaagtga ccagagctgt gatttgtccc 120  
gctgagtgga ctgctgtgtc agggagtgag tgctccatca tcgggagaat ccaagcagga 180  
ccgcatgga ggaaggtcaa tattcagaga tcgaggagct tcccaggagg cgggtgtgca 240  
ggcgtgggac tcagatcgtg ctgctggggc tggtgaccgc cgctctgtgg gctgggctgc 300  
tgactctgct tctcctgtgg cactgggaca ccacacagag tctaaaacag ctggaagaga 360  
gggctgcccg gaacgtctct caagtttcca agaacttga aagccaccac ggtgaccaga 420  
tggcgcagaa atcccagtcc acgcagattt cacaggaact ggaggaactt cgagctgaac 480  
agcagagatt gaaatctcag gacttggagc tgtcctggaa cctgaacggg cttcaagcag 540  
atctgagcag cttcaagtcc caggaattga acgagaggaa cgaagcttca gatttgtgtg 600  
aaagactccg ggaggaggtg acaaagctaa ggatggagtt gcaggtgtcc agcggctttg 660  
tgtgcaaac gtgccctgaa aagtggatca atttccaacg gaagtgtac tacttcggca 720  
agggcaccaa gcagtgggtc cacgcccgtt atgectgtga cgacatgga gggcagctgg 780  
tcagcatcca cagcccggag gagcaggact tcctgaccaa gcatgccagc cacaccggct 840  
cctggattgg ccttcggaac ttggacctga agggagagtt tatctgggtg gatgggagcc 900  
atgtggacta cagcaactgg gctccagggg agcccaccag ccggagccag ggcgaggact 960  
gctgatgat gcggggctcc ggtcgtgga acgacgcctt ctgcgaccgt aagctgggcg 1020  
cctgggtgtg cgaccggctg gccacatgca cgcccaccag cagcgaaggt tccgaggagt 1080  
ccatgggacc tgattcaaga ccagaccctg acggccgcct gcccacccc tctgcccctc 1140  
tccactcttg agcatggata cagccaggcc cagagcaaga ccctgaagac ccccaaccac 1200  
ggcctaaaag cctctttgtg gctgaaaggt ccctgtgaca ttttctgcca cccaaacgga 1260  
ggcagctgac acatctcccg ctctctatg gcccctgcct tcccaggagt acaccccaac 1320  
agcaccctct ccagatggga gtgcccccaa cagcaccctc tccagatgag agtacacccc 1380  
aacagacccc tctccagatg cagcccatc tctcagcac cccaggacct gagtatcccc 1440  
agctcaggtg gtgagtcctc ctgtccagcc tgcacataa aaatggggca gtgatggcct 1500  
ccc 1503

## REIVINDICACIONES

1. Preparación cristalina de un receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante, caracterizándose dicho receptor por la ausencia de dominios transmembránicos, péptido señal y glucosilación, y obteniéndose mediante expresión de un ácido nucleico que codifica tal receptor en procariotas.
- 5 2. Preparación cristalina según la reivindicación 1, en la que el receptor es de origen humano.
3. Preparación cristalina según la reivindicación 1 ó 2, en la que la misma contiene una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO: 3 y 4.
4. Preparación cristalina de un complejo de receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante/inmunoglobulina, en la que el receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble es según las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Uso de datos de la estructura cristalina obtenibles a partir de un receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante, y/o a partir de un complejo de un receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante y su inmunoglobulina correspondiente, en un programa de obtención de modelos asistido por ordenador, usando una preparación cristalina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la identificación y/o generación de inhibidores del receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  que son complementarios al receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante, inmunoglobulinas mutadas que son capaces de
- 15 unirse a los receptores de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$ , y de este modo evitan la unión normal entre los  $FcR$  y las partes constantes de los anticuerpos, receptores de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$ , y/o inhibidores de inmunoglobulinas que son complementarios al sitio de unión de inmunoglobulina del receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante, en el que dicho receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  se caracteriza por la ausencia de dominios transmembránicos, péptido señal y glucosilación, y se obtiene mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica tal receptor en procariotas.
- 20 6. Un método para la identificación y/o preparación producción de inhibidores del receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  o de inmunoglobulinas, así como receptores de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  o inmunoglobulinas mediante mutagénesis, que comprende las etapas de
- (i) proporcionar una preparación cristalina de un receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  soluble recombinante, caracterizándose dicho receptor por la ausencia de dominios transmembránicos, péptido señal y glucosilación, y siendo obtenible mediante
- 25 expresión de un ácido nucleico que codifica tal receptor en procariotas,
- (ii) usar la preparación cristalina obtenida de (i) para la generación de datos estructurales tridimensionales, y
- (iii) seleccionar y diseñar, basándose en los datos estructurales obtenidos en (ii),
- (a) inhibidores que son complementarios al sitio de unión del receptor de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  para inmunoglobulinas;
- (b) inhibidores que son complementarios al sitio de unión de inmunoglobulinas para receptores de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$ ;
- 30 (c) receptores de  $Fc\gamma$  o  $Fc\epsilon$  que se pueden usar como antagonistas y competidores.

FIG. 1

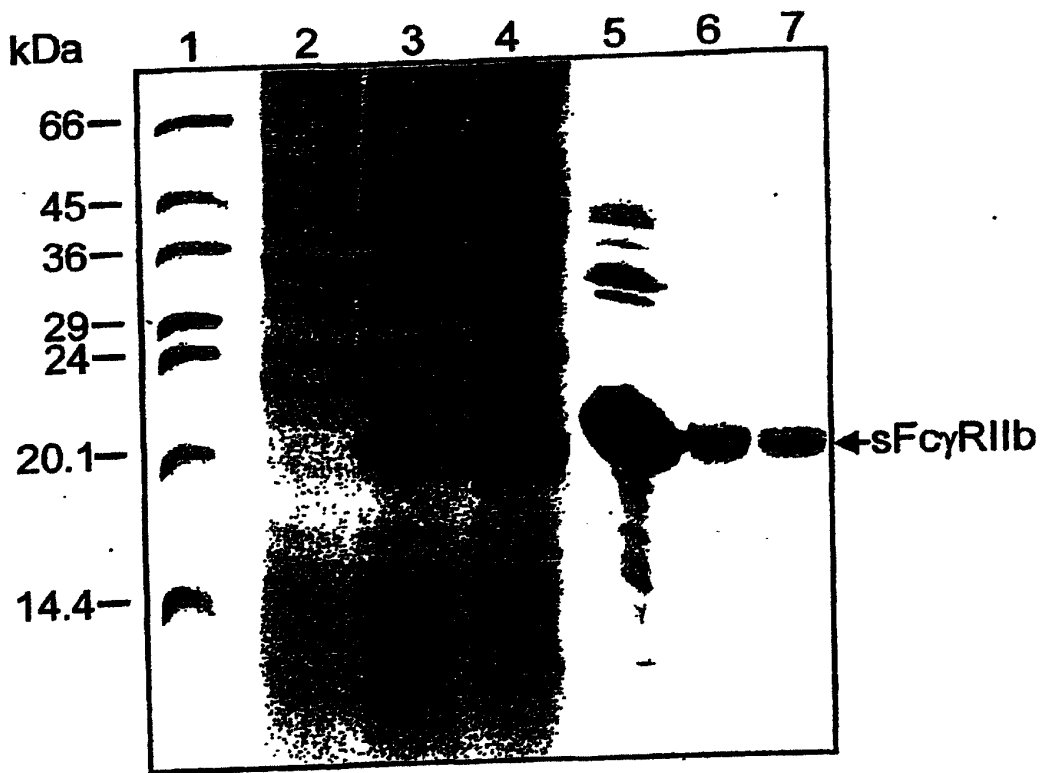




FIG. 2

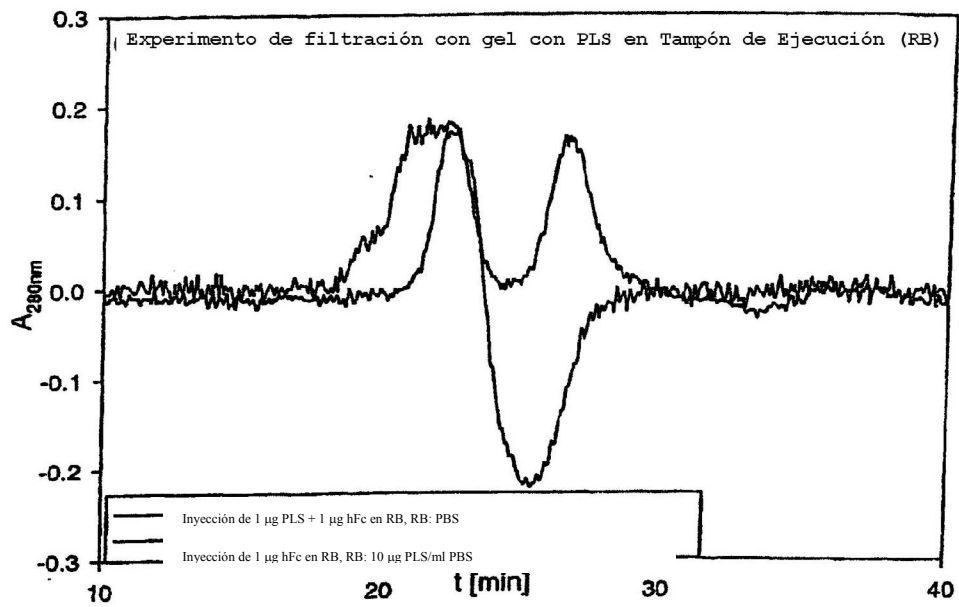


FIG. 3

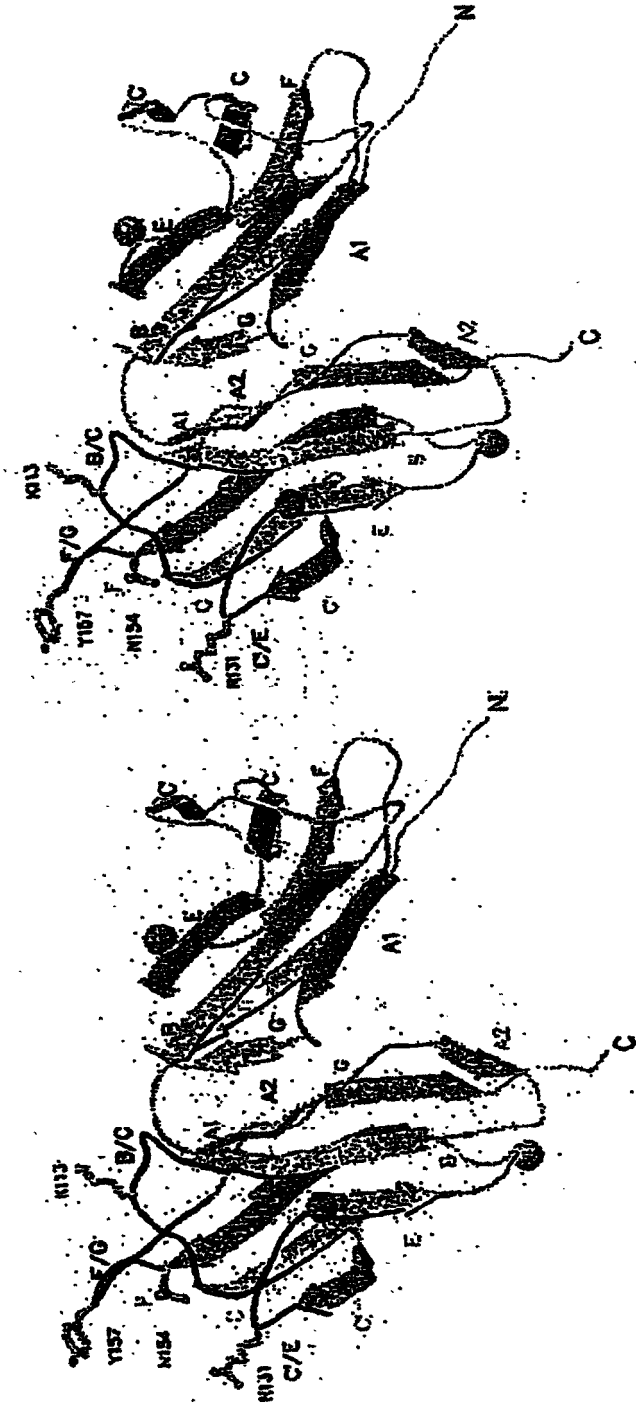


FIG. 4

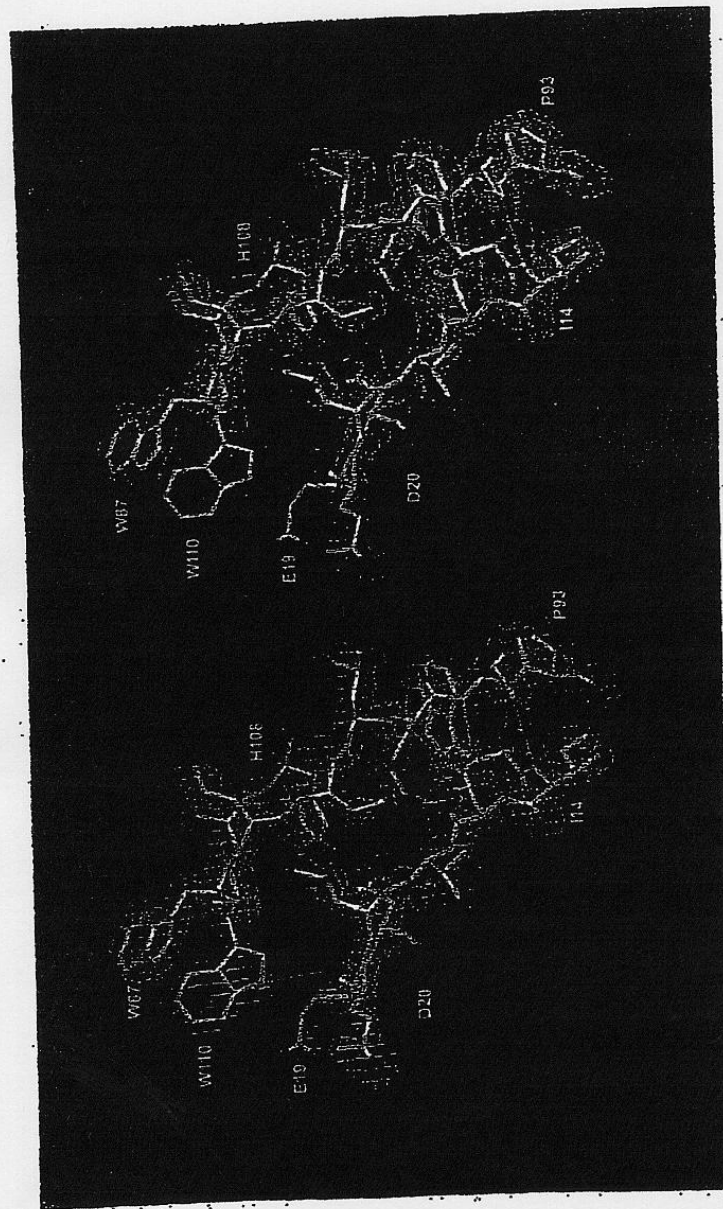


FIG. 5A

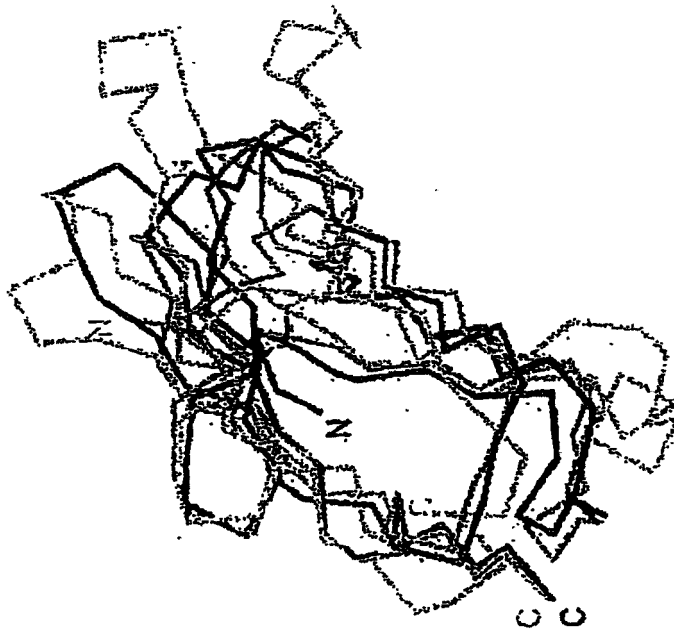
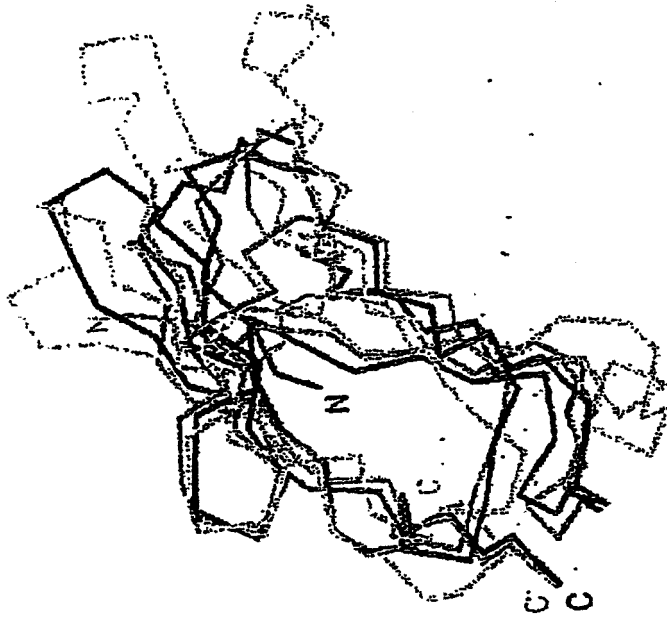


FIG. 5B (1)

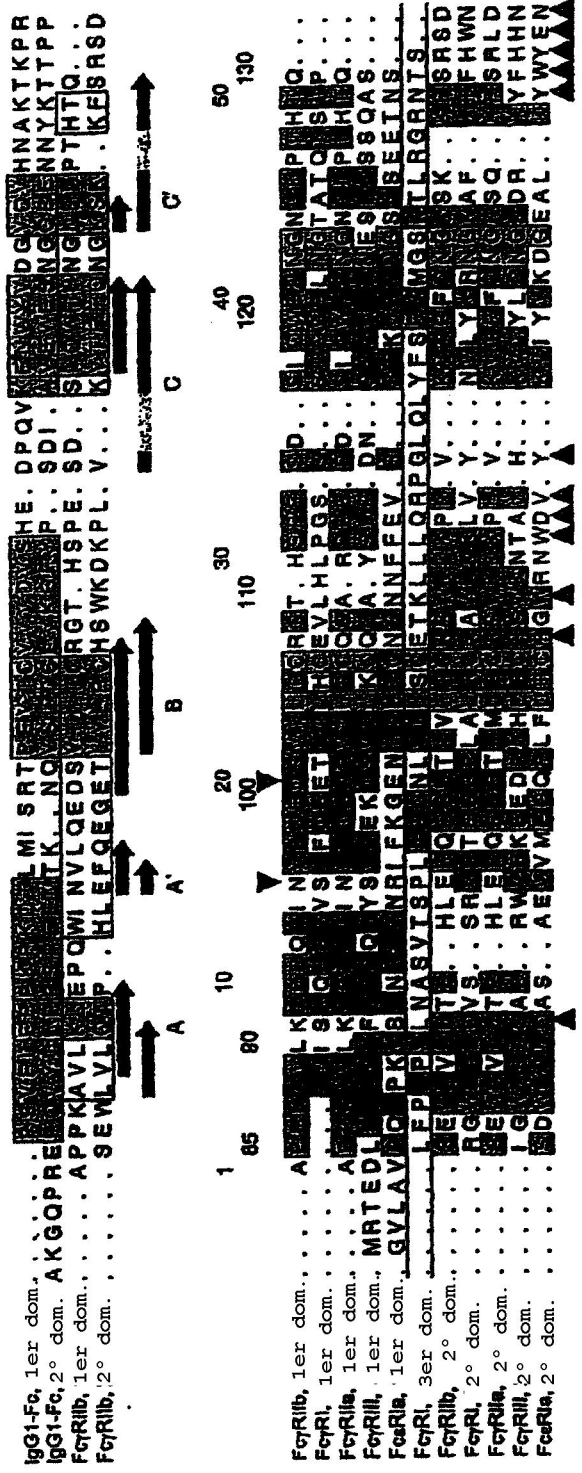




FIG. 6

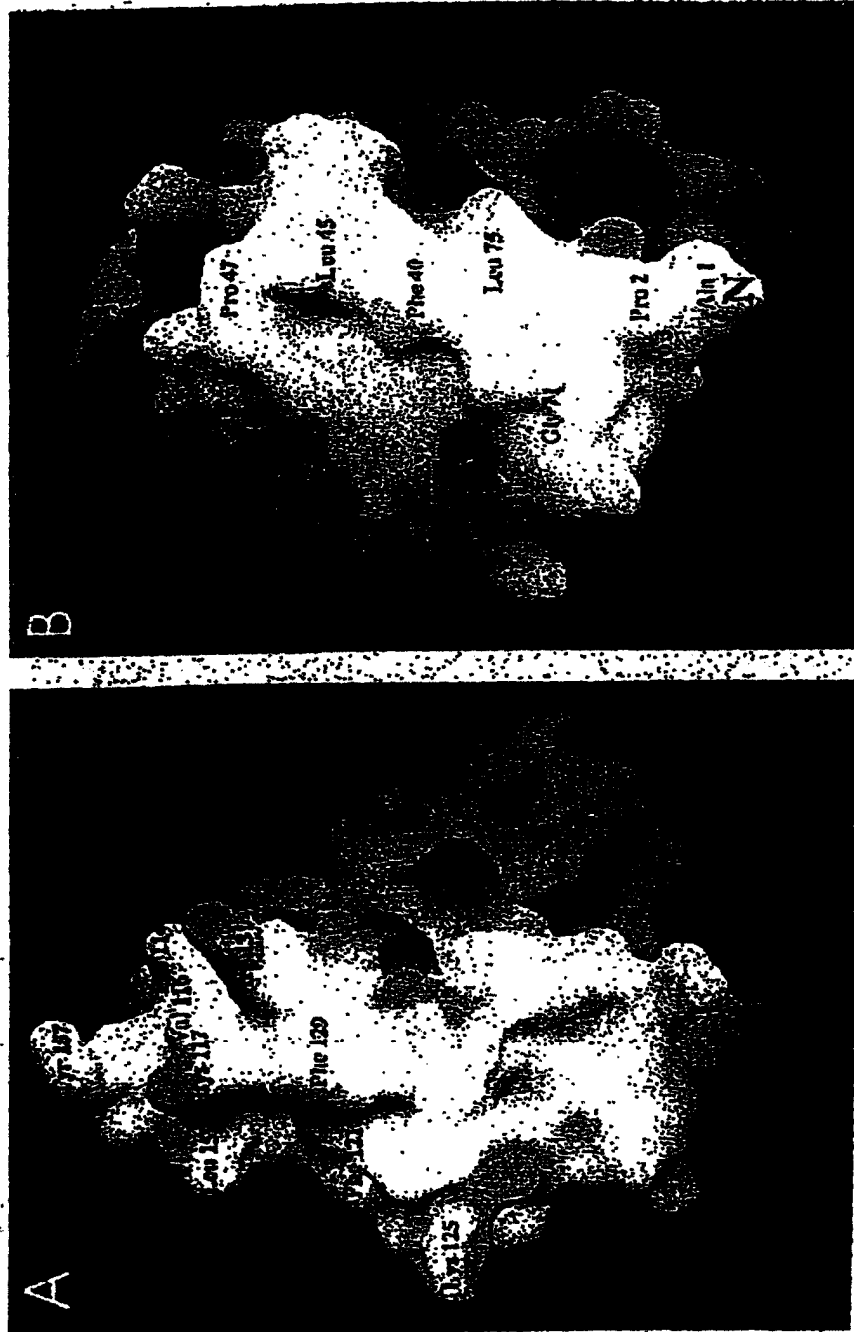


FIG. 7

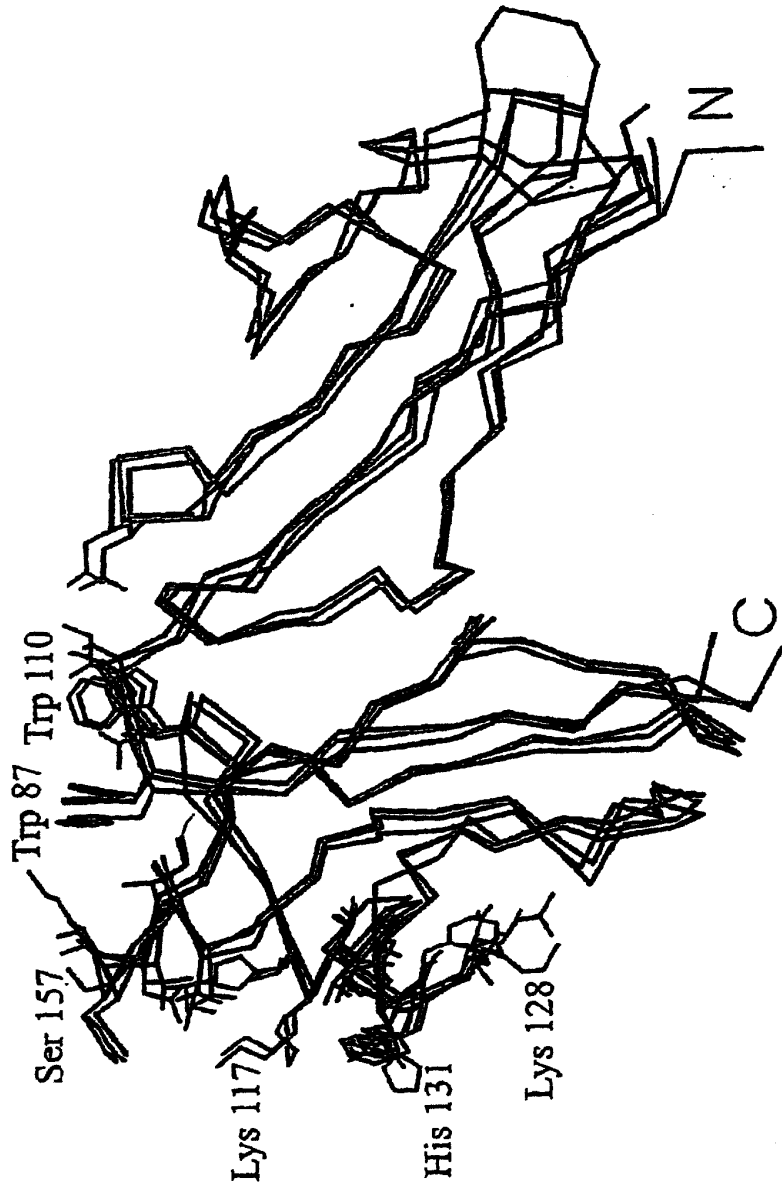




FIG. 8

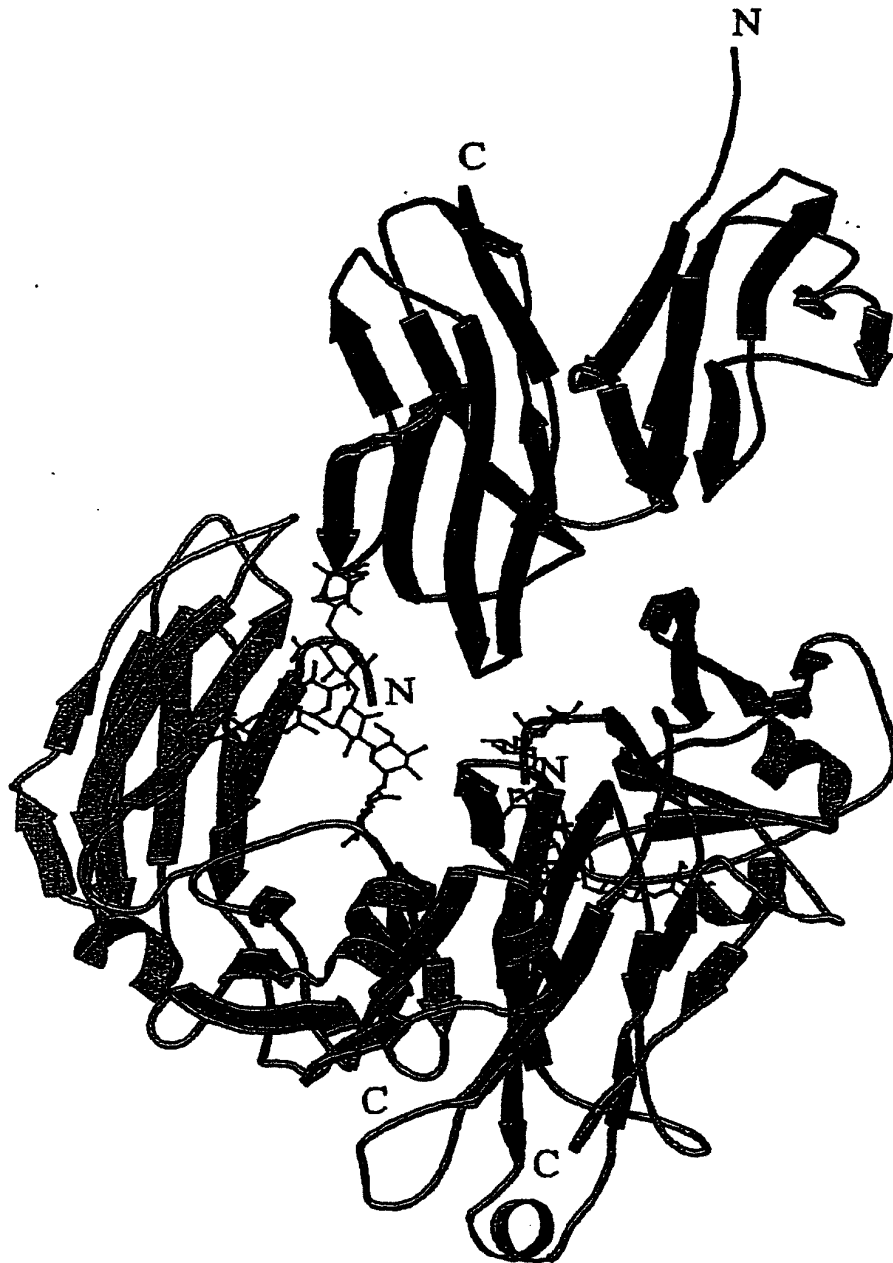


FIG. 9

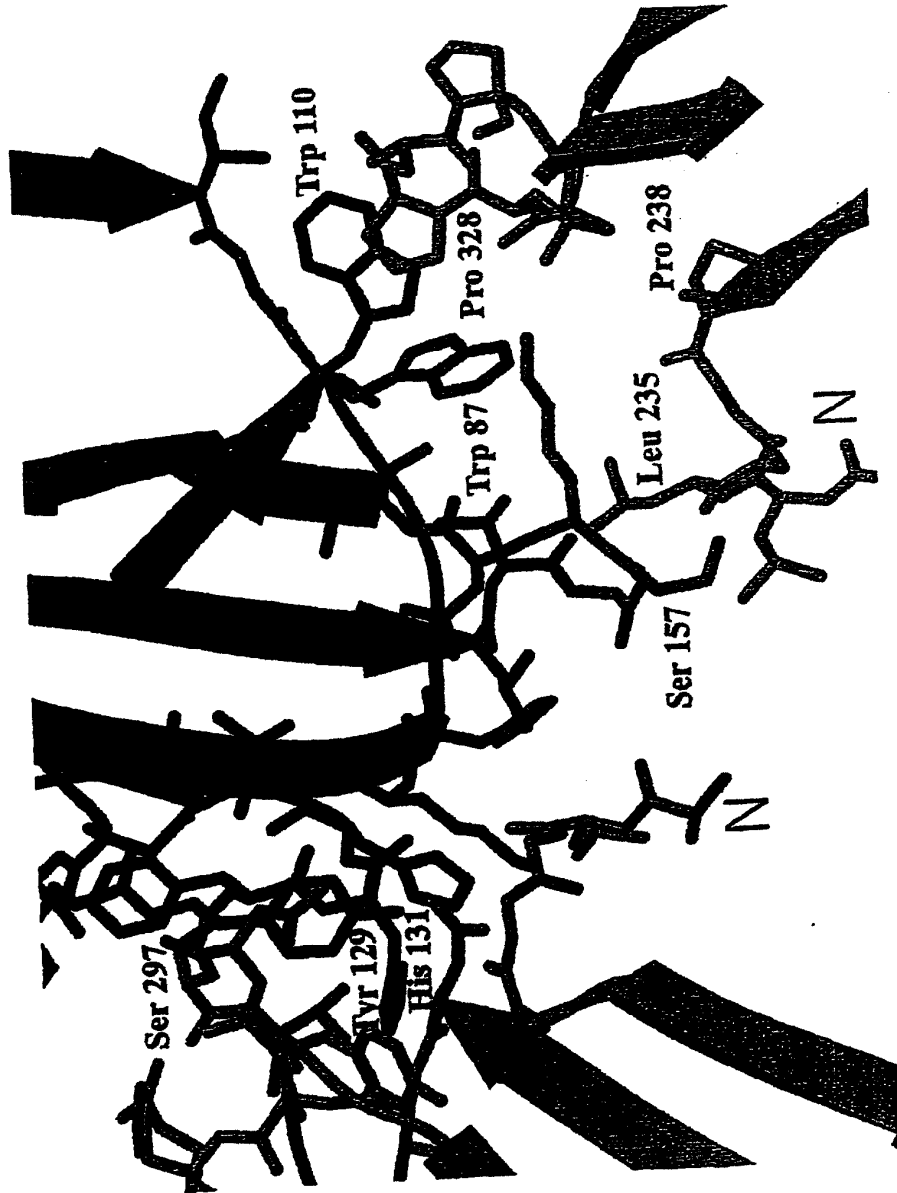


FIG. 10A (1)

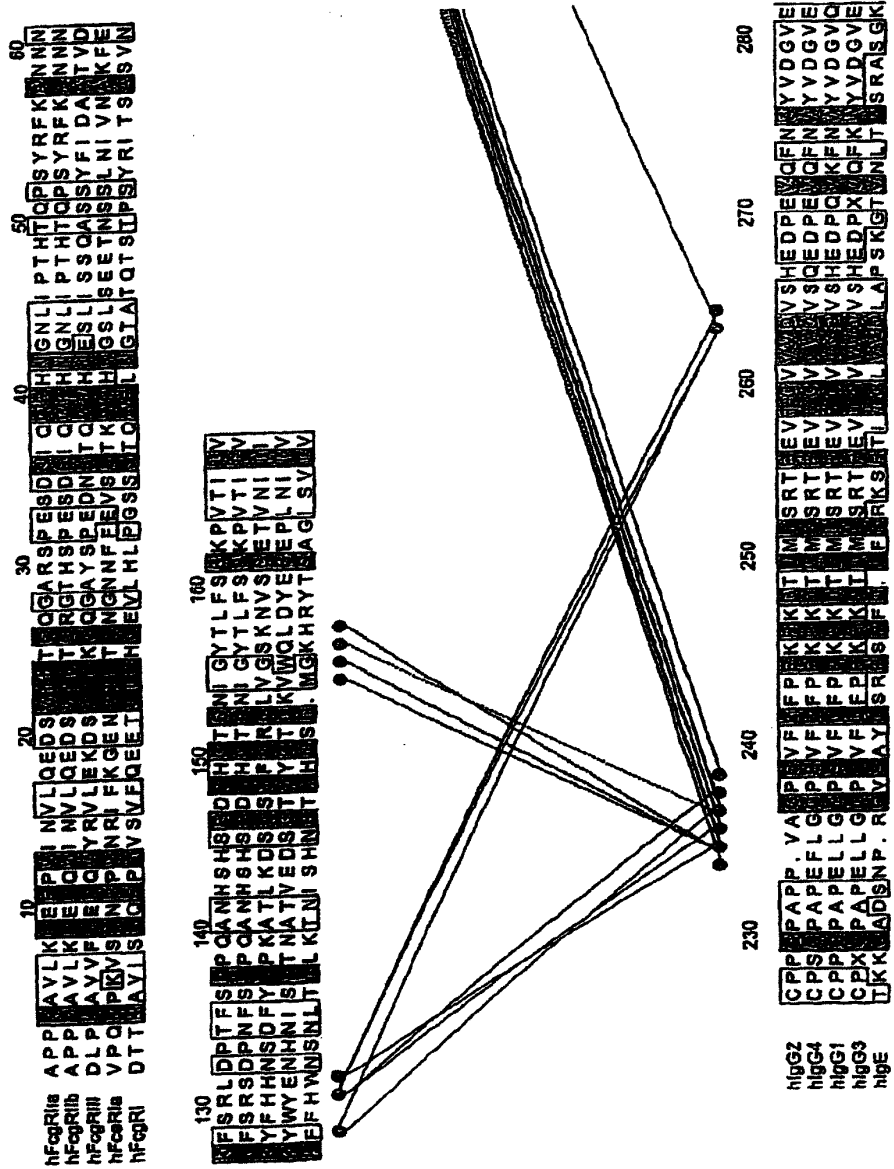


FIG. 10A (2)

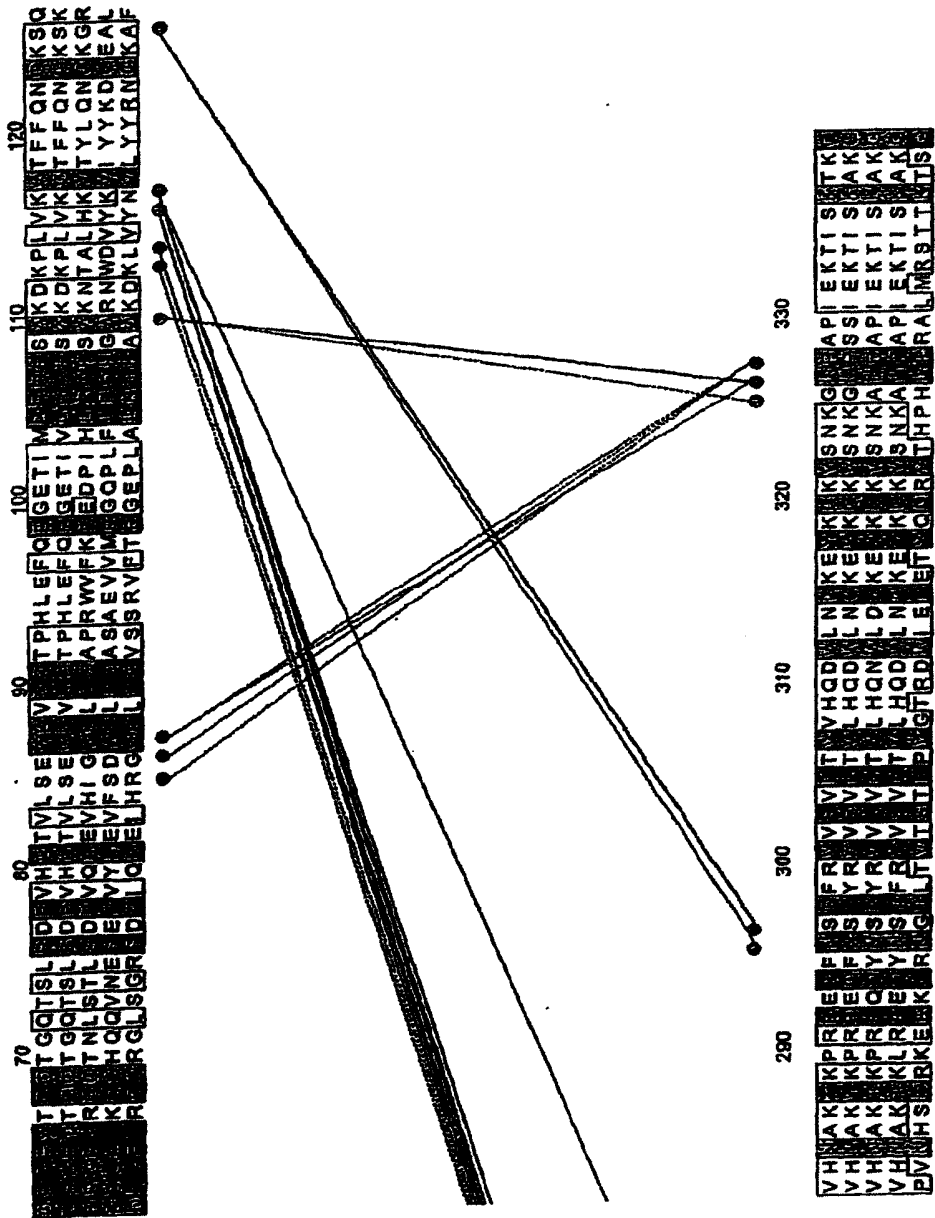






FIG. 11 (1)

Alineamiento de los sFc $\gamma$ R, sFc $\epsilon$ R1a y la forma corta de sFc $\epsilon$ R1I

```

sFc $\gamma$ RIIa  ---MAAPPKAVLKLLEPP-WINVLQEDSVTLACQARSPESDSIQWFHN-GNLIPTHTQPS 55
sFc $\gamma$ RIIb  NGTPAAPPKAVLKLLEPQ-WINVLQEDSVTLACRGTSPESDSIQWFHN-GNLIPTHTQPS 58
sFc $\gamma$ RIII  -MRTEDLPKAVVTLLEPQ-WYSLAKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFHN-ESLISSQASSY 57
sFc $\gamma$ RI    -----NAVLSLQPP-WVSVTQETVTLKCEVLEHLPGSSSTQWFLN-GTATQTSTPBY 50
sFc $\epsilon$ RIa   ---MAYPQKPKVSLMPP-WNRIFKGENVTLTCNGNNFFVYSSTKWFHN-OSLSEETNSBL 55
sFc $\epsilon$ RII   -MELQVSSGFCVNTCPKQVNFQK-----C---YIFGKTKQVWVHARZACDDMEGQLV 50
          * * . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sFc $\gamma$ RIIa  YRFFANNDSSG-EYTCQTGQTSLSDFVHLTVLSEWLV-LQTPHLEFQEGETIMLRCHSWK 113
sFc $\gamma$ RIIb  YRFFANNDSSG-EYTCQTGQTSLSDFVHLTVLSEWLV-LQTPHLEFQEGETIVLRCHSWK 116
sFc $\gamma$ RIII  FIDAAAVNDSSG-EYRCQTNLSLSDFVQLVHIGWLL-LQAPRWVFKKEEDPIHLRCHSWK 115
sFc $\gamma$ RI    RITBASVNDSSG-EYRCQGLSGRSDPIQLLELHRGWLL-LQVSSRVFTEGEPLALRCHAWK 108
sFc $\epsilon$ RIa   NIVNAKFEDESG-EYKCBQGVNESEFVYLEVFSDWLL-LQASAEVVMGQPLFLRCHGWR 113
sFc $\epsilon$ RII   SIHSPEEQPLTKHSHSWSWIGLRNLDLAKGEFIWVDSHYDYSNMAPGEPTS-RSQGED 109
          . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sFc $\gamma$ RIIa  DKPLVKVTFQNGK-SQKFSRLDPTFSIQANSHSODYHCTGNGTYTLFSSKPVTLTVQ 172
sFc $\gamma$ RIIb  DKPLVKVTFQNGK-SKKFSRSDPNSFSIQANSHSODYHCTGNGTYTLFSSKPVTLTVQ 175
sFc $\gamma$ RIII  NTALEKRVTLQNGK-DRKTFHNSDFHIPKATLKDSSYFCRGLVSGKNVSSFTVNIYF 174
sFc $\gamma$ RI    DKLVINVLTYRNGK-AFKTFHNSMLTILATNLSHNGTYHCSG-MGRHRYTSAGISVTVK 166
sFc $\epsilon$ RIa   NWDYKVIITKDGK-ALAYWIENHNSITNATVEDSGTYICTKVMQLDYSEPLNIYVI 172
sFc $\epsilon$ RII   CVMRSGRWNDAAFCDKRLGANVCDRLATCTPPASGSAESMGDPDRPDPDQRLPTPSAP 169
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

FIG. 11 (2)

SFC/RIIa	VP-----	174
SFC/RIIb	APSSSRMGII-----	185
SFC/RIII	QG-----	176
SFC/RI	ELFPAPVIANASVTSFLLLEGNLVTLSCETKLLLPQGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQ	226
SFCERIA	KAPREKYLQF-----	183
SFCERII	LHS-----	172
SFC/RIIa	-----	
SFC/RIIb	-----	
SFC/RIII	-----	
SFC/RI	ILTARREDSGLYWCREATEDGNVLKHSPELELQVLGLQLPYV	269
SFCERIA	-----	
SFCERII	-----	



FIG. 12 (1)

Alineamiento de los sFc $\gamma$ R y sFc $\epsilon$ R1a producidos sin sFc $\epsilon$ R1I

```

sFc $\gamma$ R1Ia  ---MAAPPKAVLKLPPWLNVLQEDSVTLTCQQARSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYR  57
sFc $\gamma$ R1Ib  NGTFPAAPPKAVLKLPPWLNVLQEDSVTLTCRQTHSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYR  60
sFc $\gamma$ R1Ic  -MRTEDLFKAVVFLFPQWYSLERDSVTLKQCAKSPEDNSTQWTFHNSLISSQASSIFI  59
sFc $\gamma$ R1    -----MAVISLQPFWVSVFQETVTLHCEVLHLPGSSSTQWTLNGTATQTSTPSYRI  52
sFc $\epsilon$ R1a   ---MAVPQKPKVSLNPPWNRILFKGNVTLTCGNPPFVSVSTKWFHNSLSEETNSLNI  57
           .  !  **  *  !!!  !****  *  .  *  !**  *  .
           .  !  **  *  !!!  !****  *  .

sFc $\gamma$ R1Ia  FKANNDSGEYTCQTGCTSLSDPVLTVLSMLVLQTPHELFQEGETIMLRCHSNMDKPL  117
sFc $\gamma$ R1Ib  FKANNDSGEYTCQTGCTSLSDPVLTVLSMLVLQTPHELFQEGETIYLARCHSNMDKPL  120
sFc $\gamma$ R1Ic  DAAFTVNDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLIQAPRWVFKEDPIHLRCHSNMNTAL  119
sFc $\gamma$ R1    TSASVNDSGEYRCQRGLSGRSDPIQLIHRGWLLQLQVSRVFTGEPELALRCHAWKDKLV  112
sFc $\epsilon$ R1a   YNAKPEDSGEYKQHQQVNESEPVILEVFSDWLQLQASAEVVMGQPLFLRCHGWNNQV  117
           * . !****  **  *!*: *  : **!*:. . * !:: ****.*!:: !
           * . !****  **  *!*: *  : **!*:. . * !:: ****.*!:: !

sFc $\gamma$ R1Ia  VKVTFQNGKSKF SKLDPFSIEQANSHSDYHCTGNIGYTLFSSKPVTTIVQVP---  174
sFc $\gamma$ R1Ib  VKVTFQNGKSKF SRSDPNFSIEQANSHSDYHCTGNIGYTLYSSKPVTTIVQAPSSS  180
sFc $\gamma$ R1Ic  HKVTFQNGKDRKYFHNSDFHLPKATLNDGSGYFCRGLVGSKNVSSFTVNIITITQG---  176
sFc $\gamma$ R1    YNVLTYRNGKALTFYHNSNLTILKTNISHNGTYHCSG-MGKHRYTSAGISVTVKELFPA  171
sFc $\epsilon$ R1a   YKVITYKDGKALKIWEHNISITNATVEDSGTYICTGKVNQDIESEPLNITVTKAPRE  177
           :* : !!* : * : : * !! . . . . * * * * * : * : !!* :
           :* : !!* : * : : * !! . . . . * * * * * : * : !!* :
    
```

FIG. 12 (2)

```

sFc/RIIa -----
sFc/RIIb PNGII----- 185
sFc/RIII -----
sFc/RI PVLNASVTSFLLLEGNLVTLSCEIKLLQRPQLQYFSFYMGSKTLGRNTSSEYQILFAR 231
sFcERIA KIWLP----- 183

sFc/RIIa -----
sFc/RIIb -----
sFc/RIII -----
sFc/RI REDSGLYNCEAATEDGNVLRSPLELQVLGLQIFPV 269
sFcERIA -----
    
```