

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 468**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798098 .2**
96 Fecha de presentación: **26.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1709073**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **SUSTANCIA QUE SE UNE AL RECEPTOR HUMANO IIb MEDIANTE Fc DE IgG (FcγRIIb).**

30 Prioridad:
26.11.2003 EP 03027000

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
HOFGARTENSTRASSE 8
80539 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:
**HUBER, Robert;
SONDERMANN, Peter;
JACOB, Uwe;
WENDT, Kerstin;
CHIARA, Cabrele y
MORODER, Luis**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

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).

ES 2 371 468 T3

DESCRIPCIÓN

Sustancia que se une al receptor humano IIb mediante Fc de IgG (Fc γ RIIb)

La invención se refiere a nuevos inmunógenos que poseen epítomos conformacionalmente discriminadores (CDEs), y a métodos de inmunización para producir anticuerpos que reconocen específicamente proteínas con homólogos muy estrechamente relacionados. En particular, la invención se refiere a anticuerpos que son específicos para Fc γ RIIb y que son útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, infecciones, tumores y otras afecciones en las que está implicado el sistema inmunitario.

Los receptores de Fc (FcRs) desempeñan un papel clave a la hora de defender al organismo humano frente a infecciones. Después de que los patógenos tienen acceso a la circulación sanguínea, son opsonizados por los anticuerpos (inmunoglobulinas, Igs). Esto conduce a la formación de complejos inmunitarios. Las porciones Fc de los anticuerpos se pueden unir a receptores de Fc que están presentes en virtualmente todas las células del sistema inmunitario. Existen FcRs específicos para todas las clases de Ig. La letra griega indica la clase de Ig a la que se une, es decir, los receptores de Fc γ reconocen IgG, etc.

Desde hace años se conoce que los receptores de Fc para IgG (Fc γ R) desempeñan un papel importante a la hora de accionar respuestas efectoras (Metzger, 1992A). Estas incluyen, dependiendo del Fc γ R expresado y del tipo celular, endo- y fagocitosis que dan como resultado la neutralización de los patógenos y la presentación de antígenos, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), activación de neutrófilos, regulación de la producción de anticuerpos, o la secreción de mediadores inflamatorios (Fridman et al., 1992; van de Winker y Capel, 1993; Ravetch y Bolland, 2001).

En contraste con el papel beneficioso que los FcRs desempeñan en el individuo sano, también transmiten la estimulación del sistema inmunitario en alergias (por ejemplo, mediadas por Fc ϵ R1a) o enfermedades autoinmunitarias. Además, algunos virus emplean los Fc γ Rs 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 γ Rs, como en el caso del Ébola (Yang et al., 1998) y del sarampión (Ravanel et al., 1997).

Los receptores de Fc para IgG (Fc γ R) son los más ampliamente extendidos de la familia de receptores de Fc, y se expresan en un patrón definido en todas las células activas inmunológicas. Fc γ RI se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos, y puede ser inducido en neutrófilos y eosinófilos. El papel fisiológico de Fc γ RI todavía es desconocido, ya que la expresión en monocitos no es vital (Ceuppens et al., 1988). La forma anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de Fc γ RIII (Fc γ RIIIb) se expresa exclusivamente en granulocitos. Debido a su parte citoplásmica faltante, la transducción de señales en la célula se produce solamente vía otras proteínas transmembránicas, como el receptor del complemento tipo 3 (CR3), que se pueden asociar al menos con Fc γ RIIIb (Zhou et al., 1993; Poo et al., 1995). Fc γ RIIIa se expresa principalmente en monocitos y macrófagos, pero sólo junto con una proteína asociada denominada cadena γ . Fc γ RIIIa es el receptor con la distribución más amplia en las células inmunocompetentes, y está implicado principalmente en la endocitosis de complejos inmunitarios. Fc γ RIIIb se expresa en células B, en las que es el único receptor de IgG, y en células efectoras tales como macrófagos, neutrófilos y mastocitos, pero no en células NK ni en células T.

Estructuralmente, la parte extracelular de los Fc γ Rs consiste en tres (Fc γ RI, CD64) o dos (Fc ϵ R1, Fc γ RII, CD32 y Fc γ RIII, CD16) dominios similares a Ig (aprox. 10 kDa/dominio), y por lo tanto pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. Además de los dominios extracelulares, los FcRs tienen un dominio transmembránico, y un dominio intracelular, con la excepción del Fc γ RIIIb anclado a GPI. Los receptores son homólogos entre sí, y la identidad global en la secuencia de aminoácidos entre los Fc γ Rs y el Fc ϵ R1a supera el 40% en sus regiones extracelulares. Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb difieren en su región extracelular en sólo 6% de los restos de aminoácidos. No obstante, ambas formas se pueden distinguir por sus características de unión a las subclases de IgG humana y de ratón (van de Winkel y Capel, 1993) y su distinta afinidad hacia IgGs humanas (Sondermann et al., 1999A).

Los FcRs están muy glucosilados. La secuencia de ADNc de muchos receptores de Fc es conocida, y se han generado algunos FcR recombinantes solubles. Los receptores de Fc recombinantes solubles, que se caracterizan por la ausencia de dominios transmembránicos, péptido señal y glucosilación, se describen en el documento WO 00/32767.

El documento WO 00/32767 describe polipéptidos de Fc γ RIIIb solubles que comprenden el motivo de aminoácido RGTH, que corresponde a los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIIb según la presente invención.

El documento WO 00/32767 describe además el uso del polipéptido de Fc γ RIIIb soluble para la identificación de sustancias que son capaces de actuar como inhibidores del reconocimiento y unión de anticuerpos a los receptores celulares respectivos.

Los Fc γ Rs aparecen en diversas isoformas (Fc γ R1a, b1, b2, c; Fc γ R1a1-2, b1-3, c) y alelos (Fc γ R1a1-HR, -LR; Fc γ R11b-NA1, -NA2) (van de Winkel y Capel, 1993). En contraste con las partes extracelulares homólogas globales, los dominios transmembránicos y citoplásmicos de hasta 8 kDa difieren enormemente.

Los Fc γ Rs se pueden dividir en dos clases generales según su función, que puede ser activadora o inhibidora. Los receptores activadores están asociados con un motivo de activación a base de tirosina del inmunorreceptor (ITAM) de 16 aminoácidos que tiene la secuencia de consenso Y-X₂-L/I-X₆-Y-X₂-L/I (Isakov, 1997). Este motivo se puede encontrar, por ejemplo, en Fc γ R1a. La otra clase de FcRs son los receptores inhibidores, que tienen un motivo inhibidor (ITIM) citoplásmico de 6 aminoácidos que tiene la secuencia de consenso V/I-X-Y-X₂-V/L (Isakov, 1997). Un ejemplo de tal FcR inhibidor es Fc γ R11b.

La activación e inhibición vía los motivos ITAM e ITIM se efectúan mediante fosforilación de la tirosina. Dependiendo del tipo celular particular, activadas por el receptor de Fc, diferentes tirosina cinasas están implicadas en estas rutas de señalización (Amigorena et al., 1992). Tanto los Fc γ Rs activadores como inhibidores se pueden expresar en la misma célula, lo que permite el funcionamiento de los receptores activadores e inhibidores en concierto para un ajuste fino de la respuesta inmunitaria.

Fc γ R11b tiene dos actividades inhibidoras. Una de estas depende del motivo ITIM, y se produce cuando Fc γ R11b se liga a un receptor que tiene ITAM (por ejemplo Fc γ R1a), dando como resultado la inhibición de la movilización del calcio accionada por ITAM y la proliferación celular. Esto significa que los procesos dependientes del calcio, tales como desgranulación, fagocitosis, ADCC, liberación de citocinas, y activación proinflamatoria, y también la proliferación de células B son bloqueados por Fc γ R11b. La segunda actividad inhibidora de Fc γ R11b implica la homoagregación del receptor (agrupamiento de Fc γ R11b), que envía una señal proapoptótica al citoplasma. La señal proapoptótica sólo se ha dado a conocer en células B, y se puede bloquear por ligación de Fc γ R11b al receptor de células B (BCR). Estudios in vivo sugieren que Fc γ R11b desempeña un papel en la tolerancia periférica, debido a que los ratones a los que se les ha desactivado Fc γ R11b desarrollan espontáneamente enfermedades autoinmunitarias. Por otro lado, también se ha dado a conocer que Fc γ R11b disminuye la citotoxicidad frente a tumores (Clynes et al., 2000). Los ratones deficientes en Fc γ R11b y tratados con un anticuerpo antitumoral mostraron ADCC aumentada, dando como resultado la reducción de la metástasis tumoral, mientras que los ratones deficientes en receptores de Fc activadores fueron incapaces de detener el crecimiento tumoral, cuando se trataron con el mismo anticuerpo.

La generación de anticuerpos inmunizando animales con proteínas o péptidos como inmunógenos es conocida en la técnica. Los protocolos de inmunización convencionales usan péptidos lineales como inmunógenos, que derivan de antígenos de interés. La desventaja de tales métodos es que, debido a que la estructura tridimensional de los epítopos se pierde completamente a menudo, los anticuerpos resultantes no son muy específicos, o comprenden una gran fracción de anticuerpos dirigidos a epítopos distintos de aquél de interés.

Durante la última década, los protocolos de inmunización que usan células que expresan receptores de Fc, o que usan receptores de Fc desnaturalizados, sólo han dado como resultado anticuerpos que fueron capaces de detectar específicamente receptores de Fc desnaturalizados (transferencia Western), o no fueron capaces de discriminar entre el Fc γ R1a y Fc γ R11b relacionados en estirpes celulares (por ejemplo U-937, Raji) o células sanguíneas. Hasta la fecha, no hay anticuerpos u otras sustancias de unión que se unan selectiva y específicamente a Fc γ R11b en su conformación nativa y/o su entorno natural.

Los protocolos de inmunización convencionales, que implican péptidos o proteínas recombinantes como antígenos, no son muy adecuados para producir anticuerpos específicos frente a proteínas para las cuales existen homólogos con una identidad de secuencia muy elevada. En general, los anticuerpos se producen usando como inmunógenos pequeños péptidos lineales. Tales péptidos no representan la conformación nativa del epítipo en la proteína de la que derivan. Además, la gran mayoría de los anticuerpos producidos por el animal inmunizado se dirigen contra epítopos de la proteína portadora a la que está conjugado el antígeno, o contra epítopos en el antígeno recombinante que son comunes a los homólogos. En consecuencia, los anticuerpos producidos no son específicos, y/o fallan a la hora de detectar el antígeno en su conformación nativa. Adicionalmente, se pueden localizar sitios de glucosilación en los epítopos de interés, y enmascarar estos sitios. Los protocolos de inmunización convencionales que usan estos epítopos sin la glucosilación nativa respectiva encontrada en la molécula diana dan como resultado anticuerpos que fallan a la hora de reconocer el antígeno en su conformación nativa.

Un aspecto de la presente invención es proporcionar péptidos o polipéptidos recombinantes que se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos capaces de discriminar entre un antígeno de interés y antígenos estrechamente relacionados, y un método para generar tales péptidos y los anticuerpos correspondientes y otras sustancias que tienen especificidad inmunológica.

Es un aspecto adicional de la presente invención, proporcionar sustancias que se pueden unir selectivamente a y discriminar entre subtipos de receptores de Fc, actuando de ese modo como una sustancia de unión de receptores Fc útil para el tratamiento y diagnóstico de trastornos inmunitarios, en particular enfermedades autoinmunitarias, y como agentes antitumorales que potencian la eficiencia de tales terapias promoviendo la ADCC frente a células tumorales.

Es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar un protocolo de inmunización que permitirá la generación de tales sustancias de unión a Fc γ RIIb, en particular anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales con la especificidad mencionada anteriormente.

- 5 Los inventores de la presente invención han encontrado un enfoque para desarrollar sustancias, en particular anticuerpos, que son capaces de discriminar entre proteínas muy estrechamente relacionadas y/o proteínas y antígenos con homología elevada.

Sorprendentemente, se encontró que es posible producir anticuerpos específicos frente a proteínas de interés cuando se usan como antígeno frente a los cuales se producen los anticuerpos los denominados epítopos conformacionalmente discriminadores (CDEs).

- 10 La presente invención se refiere por lo tanto a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a Fc γ RIIb humano en el entorno natural del receptor de Fc, y que se une específicamente a un péptido o polipéptido artificial que comprende un epítipo conformacionalmente discriminador (CDE) que comprende los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb según SEC ID NO. 2, en el que el péptido o polipéptido artificial tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos.

- 15 Para los fines de la presente invención, un péptido o polipéptido artificial es aquel que es producido por cualquier procedimiento técnico, tal como técnicas recombinantes, o preferiblemente mediante síntesis peptídica.

- 20 Un CDE es un epítipo en una proteína que tiene una conformación específica en la proteína. Los anticuerpos que son específicos para tal epítipo pueden discriminar entre una proteína y homólogos muy estrechamente relacionados. El CDE comprende al menos un aminoácido que difiere entre la proteína en la que está presente y los homólogos de esa proteína (resto único). Los restos únicos no necesitan estar en estrecha proximidad en la secuencia lineal de la proteína a fin de ser parte del mismo epítipo. La ventaja es que los péptidos de la invención no tienen sólo la secuencia lineal de esos epítopos, sino que también imitan su estructura. El CDE contiene al menos uno de tales restos únicos, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente más de dos de tales restos únicos. El CDE representa el sitio de unión para un anticuerpo.

- 25 Los péptidos tienen una longitud de 5, preferiblemente de alrededor de 8, más preferiblemente de alrededor de 10 a 30, más preferiblemente hasta alrededor de 20, más preferiblemente hasta alrededor de 18, más preferiblemente hasta alrededor de 15 aminoácidos.

- 30 La estabilización estructural en este contexto significa que el péptido se estabiliza de manera que el CDE está presente en su conformación tridimensional nativa en la proteína original tan próxima como sea posible. La estabilización estructural se puede lograr por un número de medios. En particular, el péptido se circulariza de manera que forma una estructura tridimensional estable, tal como un bucle. La estabilización del péptido se puede lograr mediante acoplamiento N- a C-terminal, la formación de puentes de cisteína, o formando puentes entre cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden formar pseudopéptidos.

- 35 Preferiblemente, el péptido o polipéptido también posee restos de glucosilación. El péptido se genera preferiblemente de manera que los aminoácidos glucosilados se incorporan en los mismos sitios que están glucosilados en la proteína nativa de la que deriva el CDE. Preferiblemente, los aminoácidos glucosilados se seleccionan de N-acetil-glucosamina, fucosa, xilosa, manosa, y conjugados de galactosa, pero esta lista no es exhaustiva. Si el epítipo discriminador contiene un sitio de N-glucosilación, se puede incorporar en el péptido un conjugado artificial de un resto de asparagina con una N-acetil-glucosamina, para potenciar la probabilidad de que el sustrato nativamente glucosilado sea reconocido por los anticuerpos resultantes después de la inmunización exitosa.
- 40 En consecuencia, para sitios de O-glucosilación, se puede conjugar un resto de serina o treonina se puede conjugar con un resto de manosa, fucosa, xilosa, galactosa o N-acetil-galactosamina, respectivamente.

- 45 Los péptidos y polipéptidos se pueden acoplar adicionalmente a una molécula portadora. Tales moléculas portadoras se seleccionan preferiblemente de haptenos, péptidos, polipéptidos y otros inmunógenos. Los péptidos se pueden injertar en otros péptidos y proteínas, incluso en la misma proteína o sus partes de la que se derivó el CDE.

- Según la invención, un anticuerpo o su fragmento se une específicamente a un péptido o polipéptido artificial que posee un CDE de un receptor de Fc γ RIIb que comprende los aminoácidos 27-30 de SEC ID NO: 2, en el que el péptido o polipéptido artificial tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos. Sorprendentemente se ha encontrado que
- 50 hay epítopos específicos en la porción extracelular de Fc γ RIIb que permiten la generación de anticuerpos que se unen específicamente a Fc γ RIIb. Esto es particularmente útil debido a que la familia de receptores de Fc comprende inusualmente homólogos estrechamente relacionados que son difíciles de distinguir usando anticuerpos convencionales. En particular, la presente invención hace posible generar sustancias que se unen a Fc γ RIIb pero no a Fc γ RIIa, y viceversa.

- 55 Los péptidos o polipéptidos comprenden un epítipo que comprende al menos los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb humano según la Figura 1 y SEC ID NO: 2: Gln12, Arg27, Thr29, His30,

Val104, Lys127, Ser132, Asn135, Tyr160, y Ala171. Estos péptidos pueden representar epítomos conformacionalmente discriminadores (CDEs) específicos de Fc γ RIIb, cuando se estabilizan estructuralmente mediante circularización, de una manera adecuada como se ejemplifica en la Figura 2.

5 Estos péptidos artificiales se pueden usar entonces directamente para la inmunización de animales, o se pueden acoplar a una proteína portadora, tal como haptenos o péptidos o polipéptidos, o idealmente a la propia proteína diana. En una realización preferida, un CDE de Fc γ RIIb, o un péptido que posee tal CDE, se conjuga a Fc γ RIIb o a Fc γ RIIa.

10 Los péptidos y polipéptidos se usan preferiblemente como inmunógenos para inmunizar animales a fin de generar anticuerpos específicos y, con la ayuda de la secuencia de esos anticuerpos específicos, otras sustancias inmunológicamente específicas. Los CDEs y los péptidos que los poseen se pueden usar para la generación de sustancias inmunomoduladoras que reconocen específicamente el CDE. Esto es particularmente preferido cuando se escogen CDEs de receptores de Fc, debido a que permiten la generación de anticuerpos específicos para miembros individuales de la familia de homólogos. En particular, se pueden generar anticuerpos u otra sustancia inmunomoduladora que reconoce Fc γ RIIb o Fc γ RIIa, pero no ambos al mismo tiempo. La presente invención permite
15 la generación de anticuerpos que son capaces no sólo de reconocer específicamente Fc γ RIIb y discriminar entre los dos receptores de Fc, sino también de hacerlo cuando los receptores de Fc están en su entorno natural, por ejemplo en cultivo celular o in vivo, por ejemplo en el torrente sanguíneo.

20 Acoplado el CDE a la proteína de la que derivó, se reduce la reacción inmunitaria de fondo frente a la proteína portadora. La modificación artificial por el CDE acoplado covalentemente da como resultado una respuesta inmunitaria incrementada. Esto es especialmente importante si el animal inmunizado expresa proteínas similares que serían toleradas por su sistema inmunitario. De este modo, si el péptido de la invención posee un CDE de Fc γ RIIb, está preferiblemente acoplado al propio receptor de Fc respectivo. Esto incrementa la antigenicidad. El acoplamiento se puede producir mediante enlace químico u otro medio adecuado.

25 Este método produce preferiblemente un inmunógeno con una densidad elevada de CDEs, presentándolos de ese modo en un entorno diferente y de este modo inmunógeno. La respuesta inmunitaria inicial está dirigida contra la región seleccionada como diana (CDE) que produce anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con la estructura nativa a la que se acoplan. Estos anticuerpos que reaccionan de forma cruzada maduran hacia una mayor afinidad, reconociendo también el CDE en su entorno natural.

30 Los péptidos y los CDEs también se pueden usar en la identificación de librerías moleculares para moléculas de unión (por ejemplo péptidos, moléculas orgánicas, peptidomiméticos, etc.) o librerías codificadas genéticamente (por ejemplo presentación de fagos de dominios variables de anticuerpos u otros marcos como lipocalinas), para encontrar sustancias que se unen específicamente a Fc γ RIIb. Los péptidos se pueden usar para identificar librerías de moléculas que se unen específicamente a Fc γ RIIb en células humanas.

35 El péptido se estabiliza estructuralmente mediante circularización, preferiblemente mediante acoplamiento N a C-terminal, la formación de puentes de cisteína, y/o el establecimiento de puentes entre cadenas laterales de aminoácidos formando un pseudopéptido. Como se señala anteriormente, el péptido se genera preferiblemente usando aminoácidos que poseen restos de glucosilación que están presentes en la proteína de interés. El método comprende preferiblemente la etapa adicional de conjugar el péptido a una molécula portadora, que se puede seleccionar de cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente.

40 A fin de elevar significativamente la fracción de anticuerpos que se unen específicamente, la invención proporciona el siguiente método para generar anticuerpos específicos o sus fragmentos capaces de discriminar entre Fc γ RIIb y Fc γ RIIa, en el que el método comprende inmunizar animales o animales transgénicos con un péptido o polipéptido artificial en su conformación nativa, en el que el péptido o polipéptido comprende un CDE de Fc γ RIIb, comprendiendo el CDR al menos un resto que es único para Fc γ RIIb, y en el que el CDE se estandariza
45 estructuralmente por circularización.

Para producir anticuerpos que discriminan entre un antígeno A y un antígeno B con elevada identidad de secuencia con A, los aminoácidos que difieren se cartografían a la estructura de A o un modelo de estructura respectivo de A. Los aminoácidos que difieren, que están separados por varios aminoácidos en la secuencia primaria, pueden estar en proximidad espacial. En caso de que estos aminoácidos que difieren sean accesibles desde el disolvente en la
50 estructura nativa, estas regiones superficiales se pueden considerar como epítomos conformacionalmente discriminadores (CDE). Tales epítomos se pueden construir artificialmente mediante péptidos cíclicos o análogos peptídicos, y son especialmente útiles para la generación de anticuerpos que pueden discriminar entre antígenos fuertemente relacionados.

55 En una variación de este método, se usan animales transgénicos para la inmunización, que son manipulados mediante ingeniería genética para expresar el homólogo u homólogos próximos, y más tarde se inmunizan con el antígeno diana. Los animales que expresan el Fc γ RIIb humano se inmunizan con Fc γ RIIa humano o viceversa.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a Fc γ RIIb humano en el entorno natural del receptor de Fc, y que se une específicamente a un péptido o polipéptido artificial que comprende un epítipo conformacionalmente discriminador (CDE) que comprende los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb según SEC ID NO. 2, en el que el péptido o polipéptido artificial tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos. Tales fragmentos de anticuerpos o derivados pueden discriminar entre los homólogos estrechamente relacionados de Fc γ RIIb y Fc γ RIIa en un entorno natural, por ejemplo en cultivo celular o in vivo.

En una realización preferida, el anticuerpo o su fragmento que se une a Fc γ RIIb no solamente se une específicamente a Fc γ RIIb, sino también evita que se unan las parejas de unión naturales de Fc γ RIIb, es decir, anticuerpos IgG.

En otra realización preferida de la presente invención, los anticuerpos específicos anti-Fc γ RIIb son no bloqueantes, y reconocen un epítipo distinto del sitio de interacción del receptor de Fc (por ejemplo un epítipo del dominio N-terminal alrededor de los aminoácidos 28-31). En contraste con los anticuerpos bloqueantes, estos anticuerpos tienen la ventaja de que la unión del receptor a los complejos inmunitarios no está dañada. El resultado es que la activación de los receptores por los complejos inmunitarios sigue estando intacta, y se pueden reclutar receptores adicionales para potenciar la activación. De este modo, es posible modular las funciones naturales de estos receptores de Fc independientes de la unión de IgG. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se puede escoger para ser capaces de reticular el receptor de Fc. De ese modo, se puede activar el receptor. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de la invención no interfiere con la unión del complejo inmunitario a Fc γ RIIb o Fc γ RIIa.

Por otro lado, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se puede escoger de manera que inhiba la función fisiológica de Fc γ RIIb humano.

El anticuerpo o derivado o fragmento de la invención se une preferiblemente con una afinidad por Fc γ RIIb mayor que por Fc γ RIIa. El anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se une a Fc γ RIIb con una afinidad de al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1.000 veces, más preferiblemente al menos 10.000 veces, más preferiblemente al menos 100.000 veces, más preferiblemente al menos 10^6 veces, más preferiblemente al menos 10^7 veces, más preferiblemente al menos 10^8 veces, más preferiblemente al menos 10^9 veces, más preferiblemente 10^{10} veces, más preferiblemente 10^{11} veces, más preferiblemente 10^{12} veces mayor que Fc γ RIIa.

El anticuerpo o su fragmento puede aparecer en un estado monómero o multímero.

El anticuerpo o su fragmento puede ser capaz de unirse a moléculas de receptores de Fc reticulándolas o no sobre la superficie celular. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento o su derivado es multímero a fin de reticular Fc γ RIIa o Fc γ RIIb. Como alternativa, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo es monómero, y es capaz de bloquear la unión de IgG a Fc γ RIIb humano, pero preferiblemente no es capaz de reticular Fc γ RIIb.

El anticuerpo o su fragmento de la invención también se puede modificar en el fragmento de Fc mediante la modificación de la glucosilación y/o mutagénesis para potenciar la unión hacia subconjuntos de los receptores de Fc.

El anticuerpo o su fragmento de la invención es capaz preferiblemente de unirse a un péptido o polipéptido artificial como se describe anteriormente, que comprende los aminoácidos 27 a 30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb (Figura 1, SEC ID NO: 2).

El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser cualquier sustancia natural, artificial, o producida recombinantemente, que posee una región que se puede unir a los epítopos mencionados anteriormente de Fc γ RIIb. Preferiblemente, esta región contiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del anticuerpo que se une específicamente a Fc γ RIIb. Más preferiblemente, las CDRs comprenden las secuencias como se representan en las Figuras 5 y 6.

Las CDRs descritas pueden ser la base para variaciones para mejorar adicionalmente su especificidad o diseñar nuevos anticuerpos específicos o pananticuerpos (o moléculas de unión) para otros receptores de Fc seleccionados o grupos de receptores. Se conocen métodos que incluyen mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, identificación en busca de secuencias relacionadas, y diseño en base al conocimiento o a la estructura.

Preferiblemente, el anticuerpo o su fragmento comprende una o ambas de las regiones ligera y variable y pesada variable según las SEC ID Nos: 5 y 7, y/o las regiones ligera variable y pesada variable según las SEC ID Nos: 9 y 11. Lo más preferible, el anticuerpo es CE5 o GB3.

Se prefieren anticuerpos monoclonales. Preferiblemente, es un anticuerpo o fragmento derivado del mismo que tiene un isotipo IgG, IgE, IgM o IgA. Preferiblemente, el anticuerpo es humano o humanizado, pero también puede ser de otro origen, tal como origen animal, en particular origen de ratón o de camello. El anticuerpo puede estar en diversas formas, tal como un anticuerpo monocatenario, anticuerpo bi- o trifuncional o multifuncional, fragmento Fab o Fab₂, o

como un anticuerpo completo en el que el fragmento Fc tiene una afinidad modificada hacia receptores de Fc o complemento. También puede ser un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, o un fragmento Fv, o un fragmento scv.

El anticuerpo o su fragmento también puede ser un polipéptido o análogo polipeptídico producido recombinantemente que tiene una región de unión específica que comprende la secuencia de los CDRs o una secuencia similar relacionada más de 50%, preferiblemente más de 70%, preferiblemente más de 90%, preferiblemente más de 95% con las secuencias proporcionadas. Estas secuencias también pueden ser el punto de partida para el diseño de inhibidores de receptores de Fc. Por lo tanto, también los peptidomiméticos son parte de la invención que usan o imitan motivos de secuencias de las CDRs proporcionadas.

En otra realización preferida, el anticuerpo o su fragmento es una anticalina o variante de lipocalina u otro sustituto de anticuerpo.

El anticuerpo o su fragmento obtenido se puede acoplar a una molécula efectora tal como un antígeno de interés, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas marcadoras, sustancias citotóxicas, sustancias bloqueantes estéricamente voluminosas, y moléculas ligadoras y sustancias ligadoras.

Otro aspecto de la invención son ácidos nucleicos, vectores y células hospedantes que contienen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o sus fragmentos de la presente invención como se describe anteriormente.

A partir del anticuerpo o su fragmento según la invención, se puede derivar una secuencia de ácido nucleico que codifica esta proteína. Preferiblemente, esa secuencia codifica las regiones variables, preferiblemente las CDRs que se unen a los epítomos mencionados anteriormente de FcγRIIb. Más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico codifica las CDRs según una o más de las secuencias de acuerdo con las Figuras 5 y 6. Preferiblemente, el ácido nucleico codifica la secuencia de anticuerpos monoclonales CE5 o GB3.

La secuencia de ácido nucleico se puede insertar en un vector para la expresión de la proteína según las Figuras 5 y 6, vector el cual también es un aspecto de la presente invención. El vector comprende preferiblemente un promotor bajo cuyo control se colocan las secuencias de ácido nucleico anteriores. El vector puede ser procariota o un vector de expresión eucariota, en el que el ácido nucleico recombinante se expresa solo o en fusión con otros péptidos o proteínas, o un vector adecuado para la vacunación de ADN.

La invención también proporciona una célula hospedante transfectada con el vector mencionado anteriormente. La célula hospedante puede ser cualquier célula, una célula procariota o una célula eucariota.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con la señalización mediada por receptores de Fc, que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo o su fragmento según la invención, y sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico para la detección de enfermedades autoinmunitarias y/o cáncer, que comprende un anticuerpo o su fragmento según la invención y/o el péptido o polipéptido recombinante según la invención que comprende o representa uno de los epítomos como se describe aquí, y opcionalmente reactivos marcadores, reactivos portadores y/o receptáculos adecuados.

La inmunización con los receptores de Fc no glucosilados y correctamente plegados, por ejemplo derivados de *E. coli*, y decorados con los epítomos descritos, conducen sorprendentemente a anticuerpos que reconocen específicamente receptores de Fc naturales expresados en células sanguíneas y en cultivo celular (Figura 3 y Figura 4).

El anticuerpo o su fragmento según la presente invención es útil para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o diagnóstico de afecciones que implican al sistema inmunitario. Preferiblemente, estas afecciones son enfermedades autoinmunitarias o cáncer.

Las enfermedades que se pueden tratar con un medicamento de la invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Rieter, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso.

Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden diagnosticar o tratar usando las sustancias de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, púrpura trombocitopénica idiopática, y enfermedad del hospedante frente a injerto.

Sorprendentemente, se ha encontrado que es posible potenciar ciertos procesos inmunológicos usando in vivo los anticuerpos o sus fragmentos que se unen a FcγRIIb. En particular, es posible usar aquellas sustancias de la invención para bloquear específicamente la señalización de FcγRIIb en células, e incrementar de ese modo la respuesta inmunitaria del individuo. Esto se puede usar para incrementar la ADCC frente a células tumorales. En la práctica, la sustancia que se une a FcγRIIb se da como adyuvante con un anticuerpo terapéutico. La señal inhibidora transmitida por antígenos (por ejemplo células tumorales) opsonizados con el anticuerpo terapéutico a macrófagos activados o células B se bloquea, y el sistema inmunitario del hospedante será más efectivo combatiendo el

antígeno seleccionado como diana. Esto puede ser en una manera directa marcando células tumorales que expresan Fc γ R11b (por ejemplo linfoma de células B), o usando esa sustancia de unión a Fc γ R11b como adyuvante en todos los enfoques que usan anticuerpos terapéuticos conocidos, y por lo tanto dependen de la ADCC del hospedante.

5 Los anticuerpos terapéuticos conocidos incluyen, pero no se limitan a, Herceptin®, Rituxan®, IC14, PANOREX™, IMC-225, VITAXIN™, Campath 1 H/LDP-03, LYMPHOCIDE™ y ZEVLIN™. También incluyen anticuerpos que se unen a los siguientes antígenos de cáncer: MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, beta-catenina, MUM-1, CDK-4, HER- 2/neu, papilomavirus E6 humano, papilomavirus E7 humano y MUC-1.

10 En ciertos linfomas, las células B o los mastocitos se transforman. El anticuerpo o su fragmento es capaz de reticular Fc γ R11b sobre la superficie de estas células, lo que marca a estas células para la eliminación, pero adicionalmente se transmite a estas células una señal inhibidora y proapoptótica. Este efecto es una mejora de los enfoques previos con anticuerpos terapéuticos, que dependen completamente de la ADCC del hospedante (por ejemplo Rituxan).

15 El mismo anticuerpo que reticula o bloquea los receptores de Fc se puede usar para el tratamiento de la enfermedad del hospedante frente a injerto o enfermedades asociadas con amiloides.

Para inhibir mastocitos para el tratamiento de alergias, se pueden usar los mismos constructos que bloquean y/o reticulan Fc γ R11b.

20 El anticuerpo o su fragmento se puede acoplar a IgE (por ejemplo transfiriendo las CDRs mostradas en la Figura 5 ó 6 a una molécula de IgE). En este caso, la IgE está unida por el Fc ϵ RI expresado por mastocitos, y los CDRs específicos de Fc γ R11b reticulan el ITAM de Fc ϵ RI con el ITIM del Fc γ R11b. Nuevamente, se transmite a los mastocitos una señal inhibidora y/o apoptótica, lo que es útil en la terapia de alergias.

El anticuerpo o su fragmento (por ejemplo derivados de las secuencias representadas en las figuras 5 y 6) se pueden usar para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

25 Tales sustancias inhiben células B, células dendríticas y granulocitos activados (por ejemplo macrófagos), lo que conduce a una producción reducida de mediadores estimulantes inmunitarios, y a una reducción en la producción de anticuerpos así como la presentación de antígenos (por ejemplo, en células dendríticas y en macrófagos, conduciendo a una disminución en el reclutamiento de células T). Tomado en conjunto, se inhibe el bucle de retroalimentación de la producción de anticuerpos y reestimulación del sistema inmunitario.

30 Preferiblemente, el anti-Fc γ R11b no interfiere con la unión del fragmento Fc del receptor. De esta manera, la función normal del receptor Fc, en contraste con los anticuerpos bloqueantes, se mantiene y potencia la activación de la célula mediante el reclutamiento adicional de otros receptores.

Por otro lado, los anticuerpos anti-Fc γ R11a específicos, o sus fragmentos, se pueden usar en anticuerpos para dirigir un antígeno hacia su receptor, o los fragmentos de estos anticuerpos se pueden usar para inhibir la captación de complejos inmunitarios, por ejemplo para el tratamiento de ITP.

35 Los anticuerpos o sus fragmentos se pueden usar solos o en combinación, para la producción de inhibidores específicos de la interacción Fc γ R11a/IgG o la interacción Fc γ R11/IgG.

40 A su vez, los inhibidores se pueden usar para generar estructuras cristalinas, o para el diseño a base de estructuras, o como sujeto para métodos evolutivos. Un uso adicional es la generación de secuencias modificadas a partir de aquella representada en las figuras 5 ó 6 mediante métodos evolutivos (por ejemplo, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida al sitio, o diseño basado en la estructura).

En particular, los inhibidores de los receptores de Fc se pueden usar para reducir o potenciar la especificidad de los anteriores para los receptores de Fc seleccionados. Para este fin, se pueden llevar a cabo modificaciones en las CDRs de los anticuerpos específicos, en particular de GB3 y CE5, a fin de potenciar o reducir su especificidad por Fc γ R11b.

45 El anticuerpo o su fragmento es útil para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o diagnóstico de afecciones que implican al sistema inmunitario, en particular enfermedades autoinmunitarias, preferiblemente aquellas seleccionadas de lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria, o esclerosis múltiple. Otros usos de los anticuerpos o sus fragmentos de la invención son en el diagnóstico y/o tratamiento de cáncer y/o alergias. Los mAbs CE5 o GB3, o sus fragmentos, son particularmente útiles para el
50 tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, y cáncer, en particular linfomas o leucemias.

Los mAbs CE5 o GB3, o sus fragmentos, también se pueden usar para el tratamiento de cáncer en combinación con otros compuestos terapéuticos, preferiblemente compuestos bioterapéuticos (por ejemplo anticuerpos).

El anticuerpo o sus fragmentos generados según la presente invención se pueden usar para el tratamiento y/o diagnóstico de cáncer, preferiblemente en combinación con otros compuestos terapéuticos, preferiblemente compuestos bioterapéuticos (por ejemplo otros anticuerpos). El anticuerpo o su fragmento se usa entonces como un adyuvante.

- 5 Otros usos del anticuerpo o su fragmento de la invención incluyen el uso para la producción de composiciones farmacéuticas y/o de diagnóstico para el tratamiento de enfermedad de hospedante frente a injerto, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con amiloides, o para incrementar el efecto de la vacunación o para el tratamiento de enfermedades asociadas con células dendríticas y/o macrófagos activados.

- 10 También es posible usar un anticuerpo o su fragmento, que comprenden fragmentos anti-Fc γ RIIa específicos, en anticuerpos biespecíficos para dirigir antígenos hacia el transporte mediante trombocitos y/o la captación por el sistema de fagocitosis del hígado y del bazo.

Descripción de las figuras y listado de secuencias

Figura 1:

- 15 Alineamiento de secuencias de los dominios extracelulares de Fc γ RIIb y Fc γ RIIa humanos. Los aminoácidos que difieren están encerrados en cajas.

Figura 2:

- 20 Estructura de Fc γ RIIb en una representación de cinta. Los restos únicos se muestran en bola y palo, y los sitios de glucosilación potencial se indican como esferas más grandes. Las flechas apuntan a subestructuras extraíbles posibles (epítopos 1 y 2) que se pueden generar artificialmente para la mejora de los protocolos de inmunización frente a antisueros de Fc γ RIIb específicos, y subsiguientemente para la producción de anticuerpos monoclonales específicos de isoformas.

Figura 3:

- 25 Diagrama izquierdo: Histograma de una medida mediante FACS de células Raji (positivas a Fc γ RIIb y negativas a Fc γ RIIa) usando el suero preinmune del ratón (menos), el antisuero obtenido después del procedimiento de inmunización (antisuero) y el pan-Fc γ RII-mAb AT10 (Greenman et al., 1991). Diagrama derecho: Marcador de fluorescencia en células U-937 (positivas a Fc γ RIIa y negativas a Fc γ RIIb). El antisuero reacciona sólo marginalmente con las células, indicando la presencia de anticuerpos específicos.

Figura 4:

- 30 Análisis mediante FACS de sangre humana incubada con suero normal (control negativo), antisuero de un ratón inmunizado con Fc γ RIIb-CDE[126-137], mAb AT10 o el anticuerpo monoclonal específico GB3 generado usando esta invención. a) Análisis de transferencia de punto de la muestra de sangre en términos de tamaño celular (FSC-H) y granularidad (SSC-H). Las regiones observadas R1, R2, R3 contienen linfocitos (células B y T), monocitos y granulocitos, respectivamente. b) Intensidad de la fluorescencia de las células encontradas en la región R1 que representa linfocitos. El pan-Fc γ RIIb-mAb AT10, el mAb GB3 y el antisuero tiñen las células B positivas a Fc γ RIIb, mientras que las células T negativas a Fc γ RII no son reconocidas. c) Intensidad de la fluorescencia de las células encontradas en la región R2 que representa monocitos/macrófagos. En contraste con los controles positivos, mAb AT10 y el antisuero, el mAb GB3 no reconoce los monocitos positivos a Fc γ RIIa. d) Intensidad de la fluorescencia de las células encontradas en la región R3 que representa granulocitos. En contraste con los controles positivos, mAb AT10 y el antisuero, el mAb GB3 no reconoce los granulocitos positivos a Fc γ RIIa.

Figura 5:

Las regiones variables del anticuerpo GB3 clonado. Las regiones enmarcadas en cajas representan las CDRs, mientras que los términos subrayados pueden variar debido a artefactos de clonación introducidos por el cebador. a) Región variable de la cadena ligera; b) región variable de la cadena pesada.

- 45 Figura 6:

Las regiones variables del anticuerpo CE5 clonado. Las regiones enmarcadas en cajas representan las CDRs, mientras que los términos subrayados pueden variar debido a artefactos de clonación introducidos por el cebador. a) Región variable de la cadena ligera; b) región variable de la cadena pesada.

Figura 7:

- 50 El glucopéptido CDE[126-137] usado para inmunización y generación de anticuerpos específicos de Fc γ RIIb.

Figura 8:

Inmunización de ratones SJL con un anticuerpo específico anti-Fc γ RII de ratón. Se inmunizaron SJLj con 200 μ g de MOG en el día 0. El tratamiento con anticuerpo anti-Fc γ RII (dosis de 50 μ g/semana) comenzó en el día 5. La puntuación clínica se monitorizó diariamente, y se da como la media de los 8 ratones por grupo.

- | | | |
|----|---------------|--|
| 5 | SEC ID NO: 1 | secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIa (como en la Fig. 1) |
| | SEC ID NO: 2 | secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb (como en la Fig. 1) |
| | SEC ID NO: 3 | secuencia del glucopéptido CDE [126-137] |
| | SEC ID NO: 4 | secuencia de ácido nucleico de la región ligera variable de mAb GB3 |
| | SEC ID NO: 5 | secuencia de aminoácidos correspondiente de la región ligera variable de mAb GB3 |
| 10 | SEC ID NO: 6 | secuencia de ácido nucleico de la región pesada variable de mAb GB3 |
| | SEC ID NO: 7 | secuencia de aminoácidos correspondiente de la región pesada variable de mAb GB3 |
| | SEC ID NO: 8 | secuencia de ácido nucleico de la región ligera variable de mAb CE5 |
| | SEC ID NO: 9 | secuencia de aminoácidos correspondiente de la región ligera variable de mAb CE5 |
| | SEC ID NO: 10 | secuencia de ácido nucleico de la región pesada variable de mAb CE5 |
| 15 | SEC ID NO: 11 | secuencia de aminoácidos correspondiente de la región pesada variable de mAb CE5 |

Todos los ejemplos sólo son para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Síntesis de Ciclo-[N- β -(2-acetilamino-desoxi-2- β -glucopiranosil)-Asn¹³⁸, Gly¹⁴¹]- (129-141)-Fc γ RIIb2, CDE[126-137]

Los derivados de aminoácidos estándar procedieron de Alexis (Läufelfingen, Suiza), el derivado fluorenilmetoxycarbonílico (Fmoc) de Asn(N- β -3,4,6-tri-O-acetil-2-acetilamino-desoxi-2- β -glucopiranosil)-OH procedió de Merck-Novabiochem (Darmstadt, Alemania), y la resina clorotrílica previamente cargada procedió de Pepchem (Tübingen, Alemania). Los reactivos y disolventes fueron de la mayor calidad comercialmente disponible, y se usaron sin purificación adicional. La HPLC analítica de fase inversa se llevó a cabo en un equipo Waters (Eschborn, Alemania) con una columna Symmetry C₁₈ (5 μ m, 3,9 x 150 mm, Waters) mediante elución con gradiente lineal: (1) 0-100% de A en 15 min., o (2) 0-30% de A en 20 min., hasta 50% de A en 5 min., y hasta 100% de A en otros 5 min. (caudal de 1,5 ml/min., y detección de UV a 210 nm). El sistema de elución binario fue (A) acetonitrilo/2% de H₃PO₄ (90:10) y (B) acetonitrilo/2% de H₃PO₄ (5:95). La HPLC preparativa de fase inversa se llevó a cabo en un equipo Abimed (Langenfeld, Alemania) usando Nucleosil C₁₈ PPN (5 μ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y un gradiente de 0,08% de ácido trifluoroacético (TFA) en acetonitrilo (A) y 0,1% de TFA en agua (B) a un caudal de 10 ml/min.: 2% de A durante 7 min., hasta 40% de A en 50 min., y hasta 70% de A en otros 5 min. Los espectros de ESI-MS se registraron en un espectrómetro de cuadrupolo triple Perkin-Elmer SCIEX API 165. La LC-MS se llevó a cabo con una columna Nucleosil C₁₈ (5 μ m, 100 Å, 1 x 250 mm, Macherey-Nagel) usando gradientes lineales de 0,1% de TFA en agua y 0,08% de TFA en acetonitrilo (caudal: 30 μ l/min.; detección a 210 nm).

a) Síntesis peptídica en fase sólida

El precursor peptídico lineal se sintetizó manualmente en resina de Fmoc-Gly-clorotrílico (232 mg, 0,13 mmoles) siguiendo procedimientos estándar de química Fmoc/*terc*-butilo (tBu). El grupo Fmoc se escindió en cada etapa con dos tratamientos sucesivos (3 y 20 min.) con 20% de piperidina en *N*-metilpirrolidona (NMP). Para Fmoc-Ser(tBu)-OH y Fmoc-Phe-OH, se aplicaron acoplamientos dobles (2 x 1 h) con Fmoc-aminoácido/hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU)/*N*-hidroxibenzotriazol (HOBt)/*N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) (4:4:4:8 eq.) en NMP, mientras que el derivado de Asn glucosilado se introdujo mediante acoplamiento único usando Fmoc-aminoácido/hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)-tripirrolidinofosfonio (PyBOP)/HOBt/DIEA (2:2:2:5 eq.) en NMP. La reacción se terminó después de 5 h, como se confirmó mediante el ensayo de Kaiser. Se llevó a cabo una etapa de protección de los extremos de la cadena con anhídrido acético/DIEA (1:1, 3 eq.) durante 10 min. antes del alargamiento de la cadena. Para la acilación con los derivados de aminoácidos que quedan (Arg se introdujo como el derivado Arg-2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobencofuran-5-sulfónico [Pbf]), se usaron nuevamente acoplamientos dobles (2 x 1,5 h) con Fmoc-aminoácido/HBTU/HOBt/DIEA (6:6:6:12 eq.) en NMP.

b) Escisión del péptido con cadena lateral protegida.

El péptido lineal con cadena lateral protegida se escindió de la resina tratando el péptido-resina con 5 ml de 1% de TFA en diclorometano (DCM) durante 3 min. El filtrado se analizó mediante cromatografía de capa fina (TLC) ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 8:3:1) antes de la adición de 1 ml de piridina al 10% en metanol. El tratamiento con TFA se repitió hasta que el control de TLC en el filtrado fue negativo (cuatro tratamientos globales). Finalmente, la resina se lavó con DCM y trifluoroetanol para mejorar la recuperación del péptido. Los filtrados que contienen el péptido y los lavados finales se combinaron y se concentraron hasta un pequeño volumen. El residuo se diluyó con MeOH, y el producto se precipitó con agua enfriada con hielo. El producto bruto se recogió mediante filtración (270 mg, 80% de rendimiento) y se caracterizó mediante HPLC analítica (gradiente 1) y ESI-MS. Se encontró un pico principal (t_R 9,5 min.; ESI-MS: $m/z = 2520$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M_r = 2519,0$ calc. para $\text{C}_{120}\text{H}_{188}\text{N}_{20}\text{O}_{36}\text{S}$) y un pico secundario (t_R 9,3 min.; ESI-MS: $m/z = 2478$ $[\text{M}-42+\text{H}]^+$) en la relación de 75:20 que corresponden al producto esperado y al producto secundario, respectivamente. La diferencia de masas se atribuyó a la pérdida de un grupo protector acetílico de Asn ($\text{Ac}_3\text{AcNH}-\beta\text{-Glc}$).

c) Ciclación.

La ciclación de la cadena principal se logró a una concentración peptídica de 0,9 mM en *N,N*-dimetilformamida (DMF), en presencia de PyBOP/HOBt/DIEA (1,5:1,5:3,5 eq.). La base se añadió en porciones durante 1 h. La conversión del péptido lineal en la forma cíclica se monitorizó mediante HPLC analítica, y se terminó después de 2,5 h. La mezcla de reacción se llevó a sequedad, y el residuo se trituró y se lavó con éter dietílico enfriado en hielo, para eliminar trazas de DMF antes de la escisión de TFA.

d) Escisión de los grupos protectores de la cadena lateral.

Los grupos protectores de la cadena lateral lábiles a ácidos se eliminaron disolviendo el péptido cíclico en 10 ml de TFA/trisopropilsilano (TISH)/ H_2O (90:5:5) enfriado en hielo. Después de agitar 2 h, el TFA se eliminó a presión reducida, el residuo oleoso se diluyó con una pequeña cantidad de MeOH, y el producto bruto precipitó con éter dietílico enfriado en hielo. El precipitado se recogió mediante centrifugación, se lavó varias veces con éter enfriado en hielo, y finalmente se liofilizó en agua. El glucopéptido bruto, que, además de la forma triacetilada, según LC-MS estaba contaminado con los derivados di- y monoacetilo, se suspendió en MeOH y se trató en porciones con NaOMe durante 30 min. hasta que se alcanzó un pH aparente de > 10 . La reacción se monitorizó mediante HPLC, y después de 3,5 h se paralizó por adición de ácido acético glacial hasta pH < 5 . La mezcla se llevó a sequedad, y el sólido se suspendió en MeOH y se volvió a precipitar con éter dietílico enfriado con hielo. El precipitado se recogió por filtración y se liofilizó en agua. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa, y el glucopéptido cíclico se aisló como material liofilizado; rendimiento: 20% de rendimiento (basado en la carga de resina de partida de 0,13 mmoles); HPLC: $> 95\%$ (t_R 7,37 min. con gradiente 2); ESI-MS: $m/z = 1642,8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M = 1641,8$ Da calculado para $\text{C}_{71}\text{H}_{108}\text{N}_{20}\text{O}_{25}$.

Acoplamiento del CDE[126-137] a Fc γ RIIb para producir Fc γ RIIb-CDE[126-137].

Se añadieron 100 μl de Fc γ RIIb soluble humano (10,6 mg/ml) a 1490 μl de borato 50 mM pH 10 y 410 μl del glucopéptido CDE[126-137] (2 mg/ml), y se agitó suavemente a temperatura ambiente. Se añadieron lentamente 100 μl de una disolución de glutaraldehído al 0,3%, y toda la mezcla se agitó durante otras dos horas a RT antes de añadir 100 μl de glicina 1 M. El Fc γ RIIb-CDE[126-137] resultante se agitó durante otros 30 min., y después se dializó frente a PBS, y se concentró.

Ejemplo 2**Inmunización con Fc γ IIb-CDE[126-137]**

Un ratón C57B1/6 hembra de seis semanas se inmunizó intraperitonealmente cada dos semanas con una emulsión de 50 μg de Fc γ RIIb-CDE[126-137] en 100 μl de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma/Deisenhofen, Alemania) durante tres veces. Tres semanas después de la última inmunización, el ratón se revacunó con 50 μg del Fc γ RIIb-CDE[126-137]. Tres días más tarde, se retiró el bazo del animal y se llevó a cabo la infusión de las células extraídas con células de mieloma según Bazin y Lemieux, 1989.

Ejemplo 3**Identificación del hibridoma para la especificidad por Fc γ RIIb-CDE[126-137]**

Se aislaron los clones que fueron capaces de crecer en presencia de hipoxantina, aminopterina, y timidina, y su sobrenadante se ensayó en ensayos de ELISA, en los que Fc γ RIIb-CDE[126-137] se revistió previamente en la placa de microtitulación con 120 ng de sFc γ RIIa/b por pocillo (en 100 μl de PBS, 20°C, 12 h). La placa se lavó y se incubó con PBS/T (PBS/0,2% de Tween 20, 30 min.). A cada pocillo se añadieron 100 μl del hibridoma respectivo (100 μl , 90 min.). La placa se lavó tres veces con tampón de bloqueo antes de que se añadiesen 100 μl de un anticuerpo de cabra anti-IgG + IgM de ratón marcado con peroxidasa (Dianova, Hamburgo, Alemania), diluido en

PBS/T. Después de incubar durante 90 min. y lavar posteriormente con PBS/T, se aplicaron a los pocillos 100 µl de tampón de sustrato (tampón de citrato/fosfato 0,2 M pH 5,2, 4 mg/ml de o-fenilendiamina, 0,024% (v/v) de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 8 N, y la absorbancia se midió a 490 nm en un lector de ELISA.

- 5 Los clones que fueron positivos en este ensayo se ensayaron mediante citometría de flujo (FACTS) usando 10⁵ células Raji por muestra (ATCC CCL-86), que expresan enormemente FcγRIIb humano. Tras incubar con 100 µl de sobrenadante de hibridoma durante 30 min. en hielo, las células se lavaron con 1 ml de RPMI/10% de FCS, y se precipitaron mediante centrifugación (400 x g, 4°C, 5 min.). SE añadieron 100 µl de anticuerpo anti-humano de cabra marcado con FITC (Dianova, Hamburgo/Alemania). Tras incubar durante 30 min. en hielo, las células se lavaron
- 10 (RPMI/10% de FCS) y se sometieron a citometría de flujo (FACSort, Becton Dickinson, Heidelberg/Alemania). Para cada muestra, se determinó el valor de la mediana de la fluorescencia para 5.000 células contadas. Los sobrenadantes de hibridoma que fueron positivos en este ensayo se sometieron a un ensayo similar usando células U-937 (ATCC CRL-1593.2), que expresan enormemente FcγRIIa, para determinar la especificidad del hibridoma por FcγRIIb. Como control positivo para ambas estirpes celulares, se usó el pan-FcγRII-mAb AT10 (Greenman et al.,
- 15 1991).

Ejemplo 4

Inmunización de ratones SJL con un anticuerpo anti-FcγRII de ratón específico

- Se inmunizaron ratones SJL con 200 µg de MOG para inducir encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en un modelo de animal establecido de esclerosis múltiple. El tratamiento profiláctico así como terapéutico (datos no mostrados) de 8 ratones por grupo con un anticuerpo específico anti-FcγRII de ratón (50 µg/semana) reduce
- 20 significativamente los síntomas (puntuación clínica) de la enfermedad (0 = sano, 1 = ligera parálisis, 2 = parálisis media, 3 = fuerte parálisis, 4 = parálisis completa, 5 = muerte). Los resultados se muestran en la Figura 8.

Referencias

- 25 Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Meliman, I., Fridman, W.H. (1992), Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808-1812.
- Bazin, R. y Lemieux, R. (1989), Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal anti bodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J. Immunol. Methods* 116, 245-249.
- 30 Ceuppens, J.L., Baroja, Mi., van Vaeck, F., Anderson, C.L. (1988), Defect in the membrane expression of high affinity 72kD Fc^γ receptors on phagocytic cells in four healthy subjects, *J. Clin. Invest.* 82, 571-578.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V. (2000), Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumour targets. *Nature Medicine* 6, N° 4, 443-446.
- 35 Engelhardt, W., Geerds, C., Frey, J. (1990), Distribution, inducibility and biological function of the cloned and expressed human Fc receptor II, *Eur. J. Immunol.* 20, 1367-1377.
- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.-L., Sautés, C. (1992), Structural bases of FcγR functions, *Immunol. Rev.* 125, 49-76.
- Fridman, W.H., Teillaud, J.-L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C., Sautés, C. (1993), Soluble Fc^γ receptors, *J. Leukocyte Biol.* 54, 504-512.
- 40 Greenman, J., Tutt, A.L., George, A.J., Pulford, K.A., Stevenson, -G.T., Glennie, M.J. (1991), Characterization of a new monoclonal anti-fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol. Immunol.* 28, 1243-1254.
- 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.
- 45 Isakov N. (1997), ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res.* 16, 85-100.
- Littau, R., Kurane, I. y Ennis, F.A. (1990), Human IgG FcγR II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection, *J. Immunol.* 144, 3183-3186.
- Metzger, H. (1992A), Transmembrane signaling: The joy of aggregation, *J. Immunol.* 149, 1477-1487.
- 50 Metzger, H. (1992B), The receptor with high affinity for IgE, *Immunol. Rev.* 125, 37-48.

- Poo, H., Kraus, J.C., Mayo-Bond, L., Todd, R.F., Petty, H.R. (1995), Interaction of FcγRIIIB with complement receptor type 3 in fibroblast transfectants: evidence from lateral diffusion and resonance energy transfer studies, *J. Mol. Biol.* 247, 597-603.
- 5 Ravanel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V., Rabourdincombe, C. (1997), Measles virus nucleocapsid protein binds FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* 186, 269-278.
- Ravetch, J. V. y Bolland, S. (2001), IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.
- Sondermann, P., Jacob, U., Kutscher, C., Frey J. (1999A), Characterization and crystallization of soluble human Fcγ receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells. *Biochemistry.* 38, 8469-8477.
- 10 Sondermann, P. y Jacob, U. (1999B), Human Fcγ receptor IIb expressed in *E. coli* reveals IgG binding capability. *Biol Chem.* 380, 717-721.
- Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. (2000), The 3.2A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex. *Nature* 406, 267-273.
- 15 Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. (2001), Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol.* 309, 737-749.
- van de Winkel, J.G.J. y Capet, P.J.A. (1993), Human IgG Fc receptor heterogeneity: Molecular aspects and clinical implications, *Immunol. Today* 14, 215-221.
- Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R.F., Nabel, E.G., Sanchez, A., Nabel, G.J. (1998), Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoprotein" roteins, *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 FcγRIII 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

<120> Sustancia que se une al receptor humano IIb mediante Fc de IgG

<130> 30287P-EP

5 <140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

10 <211> 172

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

15 <210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Humano

ES 2 371 468 T3

$\langle 400 \rangle$ 2

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

<210> 3

5 $\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT

<213> Humano

<400> 3

Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Gly
1 5 10

10 $\langle 210 \rangle$ 4

$\langle 211 \rangle$ 312

<212> ADN

<213> hibridoma

 $\langle 220 \rangle$

15 <221> CDS

$\langle 222 \rangle$ (1)..(312)

<400> 4

ES 2 371 468 T3

```

aga att cag ctg acc cag tct cca tcc tcc tta tct gcc tct ctg gga 48
Arg Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
  1             5             10             15

gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gaa att agt ggt tac 96
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
      20             25             30

tta agc tgg ctt cag cag aaa cca gat gga act att aaa cgc ctg atc 144
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
      35             40             45

tac gcc aca tcc gct tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
      50             55             60

agt ggg tct ggg tca aat tat tct ctc acc atc agc agc ctt gag tct 240
Ser Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
      65             70             75             80

gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat gct aat tat ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Tyr Pro Tyr
      85             90             95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 312
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      100

```

<210> 5

<211> 104

5 <212> PRT

<213> hibridoma

<400> 5

```

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
      35             40             45

Tyr Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
      50             55             60

Ser Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
      65             70             75             80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      100

```

<210> 6

10 <211> 312

ES 2 371 468 T3

<212> ADN

<213> hibridoma

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(312)

<400> 6

```

gtg cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct tca 48
Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
  1             5             10             15

gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac tat 96
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
                20             25             30

ata tac tgg gtg aaa cag tgg cct gga cag gga ctt gag tgg att gga 144
Ile Tyr Trp Val Lys Gln Trp Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
                35             40             45

tgg att ttt cct gga act ggt aat act tac tac aat gaa aac ttc aag 192
Trp Ile Phe Pro Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
                50             55             60

gac aag gcc aca ctt act ata gat aga tcc tcc agc aca gcc tac atg 240
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
        65             70             75             80

ttg ctc ggc agc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt tat 288
Leu Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Tyr
                85             90             95

ggg ccg ttt gct tac tgg ggc caa 312
Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
                100

```

<210> 7

10 <211> 104

<212> PRT

<213> hibridoma

<400> 7

ES 2 371 468 T3

```

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

```

<210> 8

<211> 331

<212> ADN

5 <213> hibridoma

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(330)

<400>

ES 2 371 468 T3

```

aga att cag ctg acc cag tct cct gct tcc tta gct gta tct ctg ggg 48
Arg Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc atc tca tac agg gcc agc aaa agt gtc agt aca tct 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

ggc tat agt tat atg cac tgg aac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aga ctc ctc atc tat ctt gta tcc aac cta gaa tct ggg gtc cct gcc 192
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag cac att agg 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95

gag ctt aca cgt tcg gag ggg gga cca agc tgg aga tct aac a 331
Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
100 105 110

```

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

5 <213> hibridoma

<400> 9

```

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
85 90 95

Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
100 105 110

```

<210> 10

<211> 343

ES 2 371 468 T3

<212> ADN

<213>.hibridoma

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(342)

<400> 10

```

gtg cag ctg cag gag tct gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca cag agc 48
Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
1 5 10 15

ctg tcc atc aca tgc acc gtc tca ggg ttc tca tta act agc tat ggt 96
Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
20 25 30

gta cac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg gta 144
Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Val
35 40 45

gtg ata tgg agt gat gga agc aca acc tat aat tca gct ctc aaa tcc 192
Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
50 55 60

aga ctg agc atc agc aag gac aac tcc aag agc caa gtt ttc tta aaa 240
Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
65 70 75 80

atg aac agt ctc caa act gat gac aca gcc atg tac tac tgt gcc aga 288
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

gag cct ccc acg acg tac gtt tgc tta ctg ggg cca agg gac cac tct 336
Glu Pro Pro Thr Thr Tyr Val Cys Leu Leu Gly Pro Arg Asp His Ser
100 105 110

aga tta a 343
Arg Leu

```

<210> 11

10 <211> 114

<212> PRT

<213> hibridoma

<400> 11

ES 2 371 468 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a Fc γ RIIb humano en el entorno natural del receptor de Fc a través de su región variable, y que se une específicamente a un péptido o polipéptido artificial que comprende un epítipo conformacionalmente discriminador (CDE) que comprende los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb según SEC ID NO. 2, en el que el péptido o polipéptido artificial tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, que se une con una afinidad al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1.000 veces, más preferiblemente al menos 10.000 veces, más preferiblemente al menos 100.000 veces, más preferiblemente al menos 1.000.000 veces mayor por Fc γ RIIb que por Fc γ RIIa.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 ó 2, que no interfiere con la unión del complejo inmunitario a Fc γ RIIb.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es capaz de activar la función fisiológica de Fc γ RIIb humano.
- 15 5. El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es capaz de reticular específicamente Fc γ RIIb humano.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que aparece en un estado monómero o multímero.
- 20 7. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es de la clase IgG, IgE, IgM o IgA.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se selecciona de anticuerpos monocatenarios, anticuerpos bifuncionales y anticuerpos trifuncionales, fragmentos Fab, fragmentos F(ab) $_2$, fragmentos Fv y fragmentos scv.
- 25 9. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 9.
11. Una célula hospedante transfectada con un vector según la reivindicación 10.
- 30 12. Uso de un péptido que comprende un CDE de Fc γ RIIb, que contiene los aminoácidos 27 a 30 de Fc γ RIIb según SEC ID NO. 2, y que tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos, para identificar librerías moleculares para moléculas de unión o librerías genéticamente codificadas para encontrar sustancias que se unen específicamente a Fc γ RIIb.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que las librerías comprenden péptidos, moléculas orgánicas, peptidomiméticos, o dominios variables de anticuerpos.
14. Uso según la reivindicación 12, para identificar librerías de moléculas que se unen específicamente a Fc γ RIIb en células humanas.
- 35 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el péptido se estabiliza estructuralmente mediante circularización.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el péptido comprende aminoácidos artificiales o/y glucosilados.
- 40 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el péptido está conjugado a una molécula portadora.
18. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende inmunizar animales o animales transgénicos con un péptido o polipéptido artificial en su conformación nativa, en el que el péptido o polipéptido comprende un CDE que comprende los aminoácidos 27-30 de la secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIb según SEC ID NO. 2, en el que el péptido o polipéptido artificial tiene una longitud de 5 a 30 aminoácidos, y en el que el CDE está estandarizado estructuralmente mediante circularización.
- 45 19. El método según la reivindicación 18, en el que el péptido o polipéptido comprende aminoácidos artificiales o/y glucosilados.

20. El método según la reivindicación 18 ó 19, en el que el péptido o polipéptido está conjugado a una molécula portadora.
21. Una composición farmacéutica y/o de diagnóstico útil para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades asociadas con la señalización mediada por el receptor de Fc, en particular artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, psoriasis o lupus eritematoso, que comprende una cantidad efectiva del anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y sustancias portadoras farmacéuticamente aceptables.
22. Un kit de diagnóstico para la detección de enfermedades autoinmunitarias y/o cáncer, que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
23. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de inhibidores o activadores de la interacción Fc γ RIIb/IgG.
24. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria, o esclerosis múltiple.
25. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el diagnóstico y/o tratamiento de cáncer, en particular linfomas o leucemias.
26. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de un adyuvante con otros compuestos bioterapéuticos para el tratamiento y/o diagnóstico de cáncer.
27. Uso de la reivindicación 26, en el que los otros compuestos terapéuticos se seleccionan del grupo que comprende los anticuerpos Herceptin®, Rituxan®, IC14, PANOREX™, IMC-225, VITAXIN™, Campath 1H/LDP-03, LYMPHOCIDE™ y ZEVLIN™, y anticuerpos que se unen a los siguientes antígenos de cáncer: MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, beta-catenina, MUM-1, CDK-4, HER- 2/neu, papilomavirus E6 humano, papilomavirus E7 humano y MUC-1.
28. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el diagnóstico y/o tratamiento de alergias.
29. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades asociadas con células dendríticas y/o macrófagos activados.
30. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento de enfermedad de hospedante frente a injerto.
31. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con amiloides.
32. Uso del anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica para incrementar el efecto de la vacunación.
33. Anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se modifica en el fragmento de Fc mediante la modificación de la glucosilación y/o mutagénesis para potenciar la unión hacia subconjuntos de los receptores de Fc.

Figura 1:

	1	10	20	30	40	50	59
FcγRIIa	AAPPKAVLKLEP[P]WINVLQEDSVTLTC[Q]GARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKAN						
FcγRIIb	AAPPKAVLKLEP[Q]WINVLQEDSVTLTC[R]GTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKAN						

	60	70	80	90	100	110	119
FcγRIIa	NDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPQTPHLEFQEGETI[M]LRCHSWKDKPLVKVT						
FcγRIIb	NDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLPQTPHLEFQEGETI[V]LRCHSWKDKPLVKVT						

	120	130	140	150	160	170	
FcγRIIa	FFQNGKSK[K]FSR[L]DPT[TF]SIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTL[E]SSKPVTTITVQ[V]P						
FcγRIIb	FFQNGKSK[K]FSR[S]DP[N]FSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTL[Y]SSKPVTTITVQ[A]P						

Figura 2:

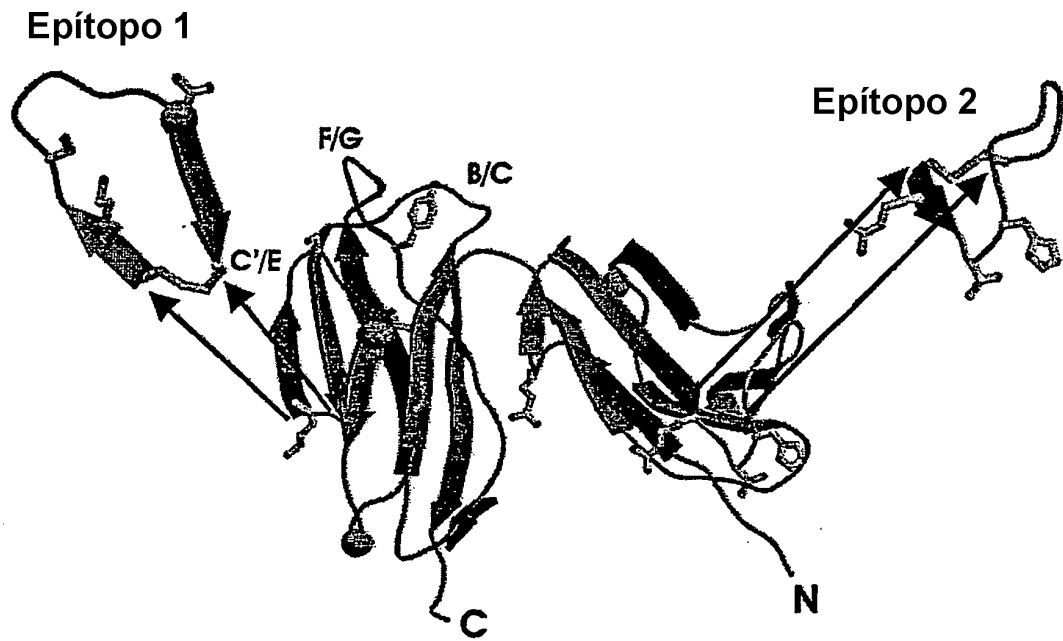


Figura 3:

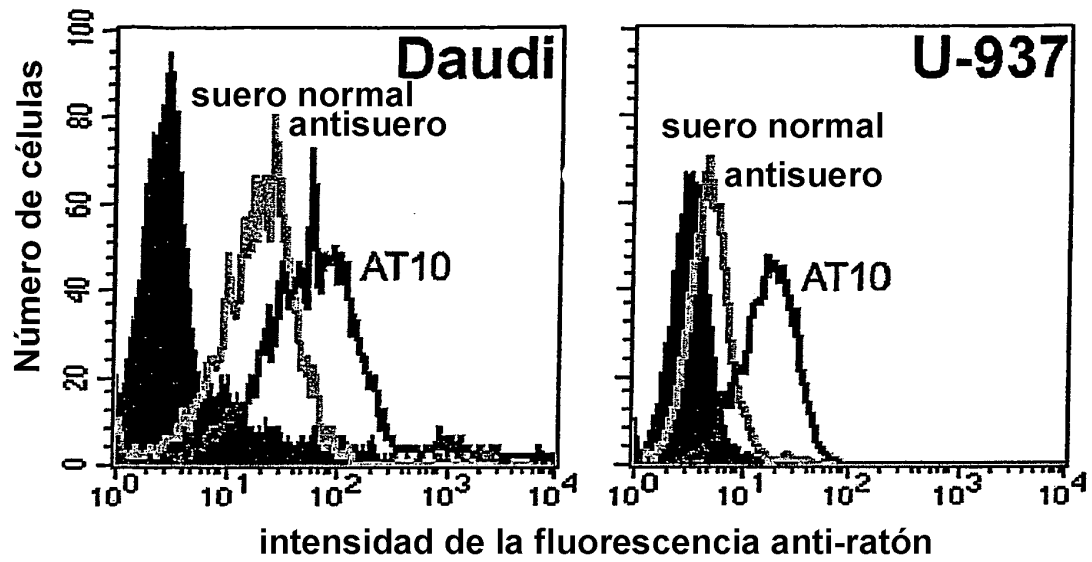
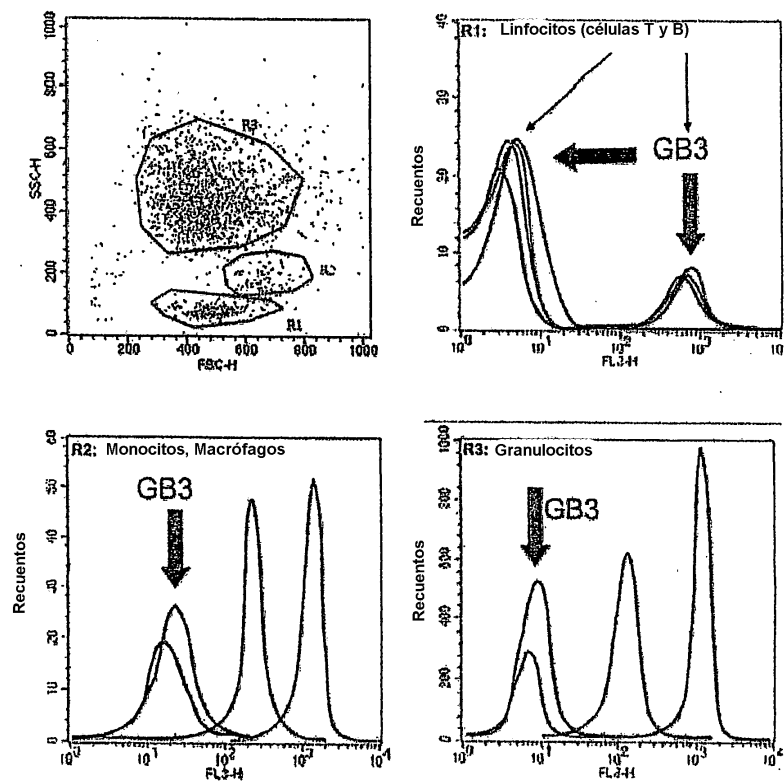


Figura 4:



Menos

Más

AT10

GB3

Figura 5:

a) Región ligera variable de mAb GB3

agaattcagctgacccagctctccatcctccttatctgcctctctgggagaaagagtcagt
 R I Q L T Q S P S S L S A S L G E R V S

ctcacttgtcgggcaagtcaggaaattagtggttacttaagctggcttcagcagaaacca
 L T C R A S Q E I S G Y L S W L Q Q K P
 CDR1

gatggaactattaaacgcctgatctacgccacatccgcttttagattctgggtgtcccaaaa
 D G T I K R L I Y A T S A L D S G V P K
 CDR2

aggttcagtggtcagtggtctgggtcaaattattctctcaccatcagcagccttgagtct
 R F S G S G S G S N Y S L T I S S L E S

gaagattttgcagactattactgtctacaatatgctaattatccgtacacgttcggaggg
 E D F A D Y Y C L Q Y A N Y P Y T F G G
 CDR3

gggaccaagctg
 G T K L

b) Región pesada variable de mAb GB3

gtgcagctgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatttcc
 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S

tgcaaggcttctggctacaccttcactgactactatatatactgggtgaaacagtggtcct
 C K A S G Y T F T D Y Y I Y W V K Q W P
 CDR1

ggacagggacttgagtggattggaaggatttttcttggaactggtaatacttactacaat
 G Q G L E W I G W I F P G T G N T Y Y N
 CDR2

gaaaacttcaaggacaaggccacacttactatagatagatcctccagcacagcctacatg
 E N F K D K A T L T I D R S S S T A Y M
 CDR2 (cont.)

ttgctcggcagcctgacctctgaggactctgcggtctatcttctgttatggtccggtttgct
 L L G S L T S E D S A V Y F C Y G P F A
 CDR3

tactggggccaa
 Y W G Q
 CDR3

Figura 6:

Región pesada variable de mAb CE5:

tcacaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcacatgcaccgtct
 L Q E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V

cagggttctcattaaccggctatgggtgtaaactgggttcgccagcctccaggaaagggctctgg
 S G F S L T G Y G V N W V R Q P P G K G L
CDR1
agtggtctgggaatgatttggggtgatggaaacacagactataattcagctctcaaattccagac
 E W L G M I W G D G N T D Y N S A L K S R
CDR2
tgagcatcagcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcacactg
 L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L H T

atgacacagccaggtactactgtgccagagagagagattataggcttgactactggggccaag
 D D T A R Y Y C A R E R D Y R L D Y W G Q
CDR3
ggaccacggtcaccgtctcctcag
 G T T V T V S S

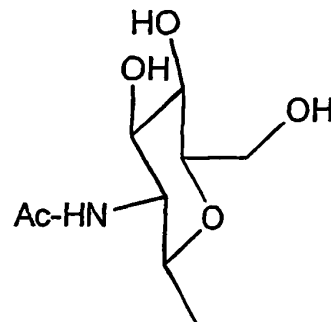
Región ligera variable de mAb CE5:

gagctcacccagtcctccagcctccctttctgcgtctgtgggagaaactgtcaccatcacatgt
 E L T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C

cgagcaagtgggaatattcacaattatttagcatgggtatcagcagaaacagggaaaatctcct
R A S G N I H N Y L A W Y Q Q K Q G K S P
CDR1
cagctcctgggtctattatacaacaaccttagcagatgggtgtgccatcaagggttcagtggcagt
 Q L L V Y Y T T T L A D G V P S R F S G S
CDR2
ggatcaggaacacaatattctctcaagatcaacagcctgcaacctgaagattttgggagttat
 G S G T Q Y S L K I N S L Q P E D F G S Y

tactgtcaacatttttggagtactcctcggacgttcggtggagggaccaagctcgaag
 Y C Q H F W S T P R T F G G G T K L E
CDR3

Figura 7:



Ser-Lys-Lys-Phe-Ser-Arg-Ser-Asp-Pro-Asn-Phe-Ser-Gly

Figura 8:

