

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 617**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03788456 .6**
96 Fecha de presentación: **14.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534335**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **Anticuerpos específicos frente a FcgammaRIIB y sus procedimientos de uso**

30 Prioridad:
14.08.2002 US 403266 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

73 Titular/es:
**MACROGENICS, INC.
1500 EAST GUDE DRIVE
ROCKVILLE, MD 20850, US**

72 Inventor/es:
**KOENIG, Scott y
VERI, Maria-Concetta**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 381 617 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos frente a Fc γ R1IB y sus procedimientos de uso

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a anticuerpos o sus fragmentos que unen específicamente Fc γ R1IB, en particular Fc γ R1IB humano, con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen Fc γ R1IA, en particular Fc γ R1IA humano. La divulgación proporciona procedimientos para potenciar el efecto terapéutico de anticuerpos terapéuticos administrando los anticuerpos de la invención para potenciar la función efectora de los anticuerpos terapéuticos. La divulgación también proporciona procedimientos para potenciar la eficacia de una composición de vacuna administrando los anticuerpos de la invención.

10 Antecedentes

2.1 Receptores de Fc y su papel en el sistema inmunitario

15 La interacción de complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da como resultado una amplia variedad de respuestas, que van desde funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos y la fagocitosis frente a señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie celular especializados sobre células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión de ligando relacionados estructuralmente que presumiblemente median la señalización intracelular.

20 Los receptores de Fc, miembros de la superfamilia de proteínas de genes de inmunoglobulina, son glucoproteínas de superficie que pueden unir la porción Fc de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento de la cadena a del receptor de Fc. Los receptores de Fc se definen por su especificidad para los subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fc para IgG se denominan Fc γ R, para IgE, Fc ϵ R y para IgA Fc α R. Diferentes células accesorias portan receptores de Fc para anticuerpos de isotipo diferente y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias participarán en una determinada respuesta (revisado por Ravetch J.V. y col. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. y col. 2001 Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. y col. 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. y col. 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. y col., 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fc, las células que los expresan y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptada de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4^a ed. 30 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores Fc γ

35 Cada miembro de esta familia es una glucoproteína de membrana integral, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un dominio único que se extiende por la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Existen tres Fc γ R conocidos, llamados Fc γ R1(CD64), Fc γ R2(CD32) y Fc γ R3(CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un origen común, quizás por duplicación génica. Esta invención se centra específicamente en los Fc γ R2(CD32).

Fc γ R2(CD32)

40 Las proteínas Fc γ R2 son glucoproteínas de membrana integrales de 40 KDa que sólo unen las IgG complejadas debido a una baja afinidad por Ig monomérica (10^6 M⁻¹). Este receptor es el Fc γ R más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Fc γ R2 sólo tiene dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y, por tanto, una afinidad mucho menor por IgG que Fc γ R1. Existen tres genes de Fc γ R2 humano (Fc γ R2-A, Fc γ R2-B, Fc γ R2-C), todos lo cuales unen IgG en agregados o complejos inmunitarios.

45 Distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de Fc γ R2-A y Fc γ R2-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas frente a la unión al receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tal como la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitoras, p. ej., inhibiendo la activación de linfocitos B.

50 Señalización a través de Fc γ R

Tanto las señales activadoras como las inhibitoras se transducen a través de los Fc γ R tras la unión. Estas funciones diametralmente opuestas son resultado de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios diferentes dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor denominados motivos de activación del immunorreceptor basados en tirosina (ITAM) o motivos inhibidores del immunorreceptor basados en

tirosina (ITIM) son responsables de las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras determina el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIAA, mientras los complejos que contienen ITIM sólo incluyen FcγRIIB.

- 5 Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante complejos inmunitarios o entrecruzamiento específico de anticuerpos sirve para agregar ITAM junto con cinasas asociadas a receptor, lo que facilita la fosforilación de los ITAM. La fosforilación de los ITAM sirve como un sitio de anclaje para la cinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos corriente abajo (p. ej., PI₃K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.
- 10 El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es un 96 % idéntico a FcγRIIA y un complejo de IgG de una manera no distinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se une con un FcγR activador, el ITIM de FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la fosfatasa de inositol 5'-polifosfato (SHIP), que hidroliza mensajeros fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasas mediada por FcγR que contienen ITAM, impidiendo en consecuencia la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Así, el entrecruzamiento de FcγRIIB amortigua la respuesta activadora frente a la unión de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. Por tanto, se anulan la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B y la secreción de anticuerpos.

TABLA 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina

Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
Unión	IgG1 10^8 M^{-1}	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	IgG1 10^{10} M^{-1}	IgG1, IgA2 10^7 M^{-1}
Tipo de célula	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhans	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Linfocitos B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
Efecto de la unión	Incorporación Estimulación Activación del estallido respiratorio Inducción de destrucción	Incorporación Liberación de gránulos	Incorporación Inhibición de la estimulación	No incorporación Inhibición de la estimulación	Inducción de destrucción	Secreción de gránulos	Incorporación Inducción de destrucción

2.2 Enfermedades de importancia

2.2.1 Cáncer

Una neoplasia, o tumor, es una masa neoplásica que resulta de un crecimiento celular incontrolado anormal que pueden ser benigno o maligno. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligno" generalmente significa que el tumor puede invadir y destruir estructuras del organismo vecinas y diseminarse a lugares alejados para provocar la muerte (para revisión, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pág. 68-122). El cáncer puede surgir en muchas zonas del organismo y comportarse de forma diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del organismo en la que se originan y después se diseminan a otra(s) parte(s) del organismo donde comienzan un nuevo crecimiento y provocan más destrucción.

Más de 1,2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa de muerte en Estados Unidos y, si las tendencias actuales continúan, se espera que el cáncer sea la causa principal de muerte para el año 2010. Los cánceres de pulmón y de próstata son los cánceres más mortíferos para hombres en Estados Unidos. Los cánceres de pulmón y de mama son los cánceres más mortíferos para mujeres en Estados Unidos. A uno de cada dos hombres de Estados Unidos se le diagnosticará un cáncer en algún momento de su vida. A una de cada tres mujeres de Estados Unidos se le diagnosticará un cáncer en algún momento de su vida.

La cura para el cáncer está aún por descubrir. Las opciones de tratamiento actuales, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento de radiación, frecuentemente son ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

Tratamiento del cáncer

Actualmente, el tratamiento del cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, tratamiento hormonal y/o tratamiento de radiación para erradicar las células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, ed., Capítulo 12, Sección IV). Hace poco, el tratamiento del cáncer también podía implicar tratamiento biológico o inmunotratamiento. Todos estos enfoques plantean desventajas significativas para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede no ser aceptable para el paciente. Adicionalmente, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. El tratamiento de radiación sólo es eficaz cuando el tejido neoplásico presenta una mayor sensibilidad a la radiación que el tejido normal y el tratamiento de radiación también puede provocar a menudo efectos secundarios graves. El tratamiento hormonal rara vez se administra como agente único y, aunque puede ser eficaz, se usa frecuentemente para evitar o retrasar la recidiva del cáncer después de que otros tratamientos hayan eliminado la mayoría de las células cancerosas. Los tratamientos biológicos/inmunotratamientos son limitados en número y pueden producir efectos secundarios tales como erupciones o edema, síntomas de tipo gripal, incluyendo fiebre, escalofríos y cansancio, problemas del tracto digestivo o reacciones alérgicas.

Con respecto a la quimioterapia, existen una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de los agentes quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis ADN, directamente o indirectamente, mediante la inhibición de la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótidos trifosfato, para evitar la duplicación del ADN y la división celular simultánea (véase, por ejemplo, Gilman y col., Goodman y Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Octava Ed. (Pergamom Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, antimetabolitos, tales como metotrexato e hidroxiurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campotetinas, bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, etc., aunque no son necesariamente específicos del ciclo celular, destruyen células durante la fase S debido a su efecto sobre la duplicación del ADN. Otros agentes, específicamente la colchicina y los alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el conjunto de microtúbulos, dando como resultado la detención de la mitosis. Los protocolos de quimioterapia implican generalmente la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para incrementar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia tiene muchas desventajas (véase, por ejemplo Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, ed., cap. 12, sec. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos y la quimioterapia provoca efectos secundarios significativos y a menudo peligrosos, incluyendo náuseas graves, depresión de la médula ósea, inmunosupresión etc. Adicionalmente, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, esas células resistentes a los agentes quimioterapéuticos concretos usados en el protocolo de tratamiento demuestran a menudo ser resistentes a otros fármacos, incluso aquellos agentes que actúan por mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos usados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina resistencia pleotrópica a fármaco o multifármaco. Por tanto, debido a la resistencia a fármaco, muchos cánceres resultan resistentes a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos para el cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer que se ha mostrado resistente a tratamientos para el cáncer estándar, tales como cirugía, tratamiento de

radiación, quimioterapia y tratamiento hormonal. El inmunotratamiento es una alternativa prometedora, en el que se dirigen específicamente anticuerpos específicos de antígenos cancerosos a células cancerosas. Se han dedicado grandes esfuerzos a aprovechar la especificidad de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, la tecnología de hibridoma ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos de tumores (véase Green M.C. y col., 2000, Cancer Treat. Rev., 26: 269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(supl. 14):43-51) y, en los últimos años, la Food and Drug Administration ha aprobado los primeros AcM para tratamiento del cáncer: Rituxin (anti-CD20) para linfoma no hodgkiniano y Herceptin [anti-(c-erb-2/HER-2) para cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora del anticuerpo, p. ej., para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") es un obstáculo para dicho tratamiento. Por tanto, se necesitan procedimientos para mejorar la eficacia de dicho inmunotratamiento.

2.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias

La inflamación es un proceso mediante el cual los linfocitos y las sustancias químicas del organismo protegen nuestros organismos de la infección por sustancias exógenas, tales como bacterias y virus. Se caracteriza normalmente por dolor, edema, calor y rojez de la zona afectada. Sustancias químicas conocidas como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso y son liberadas en una cascada autolimitante y ordenada a la sangre o los tejidos afectados. Esta liberación de sustancias químicas incrementa el flujo sanguíneo hacia la zona de lesión o infección y puede dar como resultado el enrojecimiento y el calor. Algunas de las sustancias químicas provocan fugas de líquidos hacia los tejidos, dando lugar a edema. Este proceso protector puede estimular los nervios y provocar dolor. Estos cambios, cuando se producen durante un periodo limitado en la zona pertinente, trabajan en beneficio del organismo.

En trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inflamatoria cuando no hay sustancias exógenas que combatir y el sistema inmunitario del organismo, normalmente protector, provoca daños a sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al organismo de diferentes formas. Por ejemplo, en individuos con esclerosis múltiple se ve afectado el cerebro, en individuos con enfermedad de Crohn se ve afectado el intestino y en individuos con artritis reumatoide se ven afectados la membrana sinovial, el hueso y el cartílago de diversas articulaciones. A medida que los trastornos autoinmunitarios progresan, pueden dar como resultado la destrucción de uno o más tipos de tejidos del organismo, el crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función de un órgano. Los trastornos autoinmunitarios pueden afectar sólo a un órgano o tipo de tejido o pueden afectar a varios órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejido conjuntivo, glándulas endocrinas, (p. ej., la glándula tiroidea o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

La artritis reumatoide (AR) y la artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. Artritis es un término general que describe la inflamación de las articulaciones. Algunos tipos de artritis, pero no todos, son el resultado de una inflamación mal dirigida. Además de la artritis reumatoide, otros tipos de artritis asociados con inflamación incluyen los siguientes: artritis psoriásica, síndrome de Reiter, artritis por espondilitis anquilosante y artritis gotosa. La artritis reumatoide es un tipo de artritis crónica que se produce en articulaciones en ambos lados del cuerpo (tales como ambas manos, muñecas o rodillas). Esta simetría ayuda a distinguir la artritis reumatoide de otros tipos de artritis. Además de afectar a las articulaciones, la artritis reumatoide puede afectar ocasionalmente a la piel, ojos, pulmones, corazón, sangre o nervios.

La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1 % de la población mundial y es potencialmente incapacitante. Hay aproximadamente 2,9 millones de incidencias de artritis reumatoide en Estados Unidos. Hay dos o tres veces más mujeres afectadas que hombres. La edad típica a la que se produce la artritis reumatoide es entre los 25 y los 50. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71.000 jóvenes estadounidenses (de dieciocho años de edad y menos), afectando seis veces más a las chicas que a los chicos.

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario del organismo identifica inadecuadamente las membranas sinoviales que segregan el fluido lubricante de las articulaciones como exógenas. Como resultado se produce la inflamación y el cartílago y los tejidos de las articulaciones y alrededores se dañan o destruyen. En casos graves, esta inflamación se extiende al cartílago circundante y tejidos de otras articulaciones, donde puede erosionar o destruir el hueso y el cartílago y conducir a deformaciones articulares. El organismo sustituye el tejido dañado con tejido cicatricial, haciendo que los espacios normales dentro de las articulaciones se estrechen y que los huesos se fusionen. La artritis reumatoide crea rigidez, edema, cansancio, anemia, pérdida de peso, fiebre y, a menudo, dolor incapacitante. Algunos síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez articular al despertarse que dura una hora o más; edema en una articulación específica de un dedo o una muñeca; edema del tejido blando circundante de las articulaciones; y edema en ambos lados de la articulación. El edema puede producirse con o sin dolor y puede empeorar progresivamente o permanecer igual durante años antes de progresar.

El diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, incluyendo: la localización específica y la simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez articular por la mañana, la presencia de protuberancias y nódulos bajo la piel (nódulos reumatoides), resultados de pruebas de rayos X que sugieren artritis reumatoide y/o resultados positivos de un análisis de sangre denominado factor reumatoide. Muchas personas, aunque no todas, con artritis reumatoide tienen el anticuerpo de factor reumatoide en su sangre. El factor reumatoide puede estar presente en personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades pueden provocar también que se produzca el factor reumatoide en la sangre. Es por eso que el diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no sólo en la presencia del factor reumatoide en la sangre.

El curso típico de la enfermedad es uno de síntomas articulares persistentes pero fluctuantes y, después de aproximadamente 10 años, el 90 % de los pacientes presentan daño estructural en el hueso y el cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una enfermedad corta que desaparece completamente y otro pequeño porcentaje tendrá una enfermedad muy grave con muchas deformaciones articulares y, ocasionalmente, otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio provoca erosión o destrucción de huesos y cartílago en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmunitario de presentación de antígenos persistente, estimulación de linfocitos T, secreción de citocinas, activación de células sinoviales y destrucción articular. La enfermedad tiene un impacto importante tanto en el individuo como en la sociedad, provocando dolor, función deficiente y discapacidad, así como el coste de millones de dólares en gastos de atención sanitaria y pérdidas salariales. (véase, por ejemplo, la página web del NIH y la página web del NIAID).

El tratamiento disponible actualmente para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicaciones antiinflamatorias o inmunosupresoras. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis son, generalmente, antiinflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los "fármacos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque éstos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten con sólo estas líneas de tratamiento. Los recientes avances en la comprensión de la patogénesis de la artritis reumatoide han conducido al uso de metotrexato en combinación con anticuerpos frente a citocinas o receptores solubles recombinantes. Por ejemplo, se han usado receptores solubles recombinantes para factor de necrosis tumoral (TNF)- α en combinación con metotrexato en el tratamiento de la artritis. No obstante, sólo aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α tales como receptores solubles recombinantes para TNF- α muestran una mejoría clínicamente significativa. Muchos pacientes siguen siendo resistentes a pesar del tratamiento. Aún quedan asuntos de tratamiento difíciles para pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden evitar completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, no existe un tratamiento ideal y no hay cura. Se necesitan agentes terapéuticos novedosos que traten de manera más eficaz la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios.

2.2.3 Alergia

Las reacciones alérgicas mediadas por inmunidad (hipersensibilidad) se clasifican en cuatro tipos (I-IV) de acuerdo con los mecanismos subyacentes que conducen a la expresión de los síntomas alérgicos. Las reacciones alérgicas de tipo I se caracterizan por la liberación mediada por IgE de sustancias vasoactivas tales como histamina desde mastocitos y basófilos. La liberación de estas sustancias y la subsiguiente manifestación de síntomas alérgicos se inician por el entrecruzamiento de IgE unidas a alérgeno con su receptor en la superficie de mastocitos y basófilos. En individuos que padecen reacciones alérgicas de tipo I, la exposición a un alérgeno por segunda vez conduce a la producción de niveles altos de anticuerpos de IgE específicos para el alérgeno como resultado de la implicación de linfocitos B y T de memoria en la interacción de 3 células necesaria para la producción de IgE. Los elevados niveles de anticuerpos de IgE producidos provocan un incremento en el entrecruzamiento de los receptores de IgE en mastocitos y basófilos por IgE unidas a alérgeno, que a su vez conduce a la activación de estas células y la liberación de los mediadores farmacológicos que son responsables de las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas de tipo I.

Se han identificado y caracterizado dos receptores con afinidades diferentes por IgE. El receptor de alta afinidad (Fc ϵ RI) se expresa en la superficie de mastocitos y basófilos. El receptor de baja afinidad (Fc ϵ RII/CD23) se expresa en muchos tipos celulares incluyendo linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, eosinófilos y células de Langerhans. El receptor de alta afinidad de IgE consta de tres subunidades (cadenas alfa, beta y gamma). Varios estudios demuestran que únicamente la cadena alfa está implicada en la unión de IgE, mientras que las cadenas beta y gamma (que son proteínas transmembranarias o citoplásmicas) son necesarias para acontecimientos de transducción de señales. La identificación de estructuras de IgE necesarias para que las IgE se unan a los Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos es de suma importancia en la elaboración de estrategias para tratar o evitar alergias mediadas por IgE. Por ejemplo, la elucidación del sitio de unión al receptor de IgE podría conducir a la identificación de péptidos o moléculas pequeñas que bloquean la unión de IgE a las células que portan los receptores *in vivo*.

Actualmente, las reacciones alérgicas mediadas por IgE se tratan con fármacos tales como antihistamínicos y corticoesteroides que intentan aliviar los síntomas asociados con reacciones alérgicas contrarrestando los efectos de las sustancias vasoactivas liberadas desde mastocitos y basófilos. Las dosis altas de antihistamínicos y corticoesteroides tienen efectos secundarios perjudiciales (p. ej., alteración del sistema nervioso central, estreñimiento, etc.). Por tanto, son necesarios otros procedimientos para tratar las reacciones alérgicas de tipo I.

Un enfoque para el tratamiento de trastornos alérgicos de tipo I ha sido la producción de anticuerpos monoclonales que reaccionan con IgE soluble (libre) en suero, bloquean la unión de IgE a su receptor en mastocitos y basófilos y no se unen a IgE unida a receptor (es decir, no son anafilactogénicos). Dos de esos anticuerpos monoclonales están en etapas avanzadas de desarrollo clínico para el tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE (véase, por ejemplo, Chang, T.W., 2000, *Nature Biotechnology* 18:157-62).

Uno de los tratamientos más prometedores para reacciones alérgicas mediadas por IgE es la inmunización activa frente a epítomos no anafilactogénicos apropiados en IgE endógenas. Stanworth y col. (en la patente de EE. UU. N.º 5.601.821) describieron una estrategia que implica el uso de un péptido derivado del dominio CεH4 de la IgE humana acoplado a una proteína transportadora heteróloga como vacuna para la alergia. No obstante, se ha demostrado que este péptido no induce la producción de anticuerpos que reaccionan con IgE solubles nativas. Además, Hellman (en la patente de EE. UU. 5.653.980) propuso composiciones de vacuna anti-IgE basadas en la fusión de dominios CεH2-CεH3 de longitud completa (aproximadamente 220 aminoácidos de longitud) con una proteína transportadora exógena. Sin embargo, los anticuerpos inducidos por las composiciones de vacuna anti-IgE propuestas en Hellman muy probablemente darán como resultado la anafilaxia, ya que se ha demostrado que los anticuerpos frente a algunas porciones de los dominios CεH2 y CεH3 de la molécula de IgE se entrecruzan con el receptor de IgE en la superficie de mastocitos y basófilos y conducen a la producción de mediadores de anafilaxia (véase, p. ej., Stadler y col., 1993, *Int. Arch. Allergy and Immunology* 102:121-126). Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de tratamientos de reacciones alérgicas mediadas por IgE que no induzcan anticuerpos anafilácticos.

La preocupación significativa acerca de la inducción de la anafilaxia ha dado como resultado el desarrollo de otro enfoque para el tratamiento de trastornos alérgicos de tipo I que consiste en mimótopos que podrían inducir la producción de anticuerpos policlonales anti-IgE cuando se administran a animales (véase, p. ej., Rudolf, y col., 1998, *Journal of Immunology* 160:3315-3321). Kricek y col. (en la publicación internacional N.º WO 97/31948) rastrearon colecciones de péptidos presentados en fagos con el anticuerpo monoclonal BSW17 para identificar mimótopos peptídicos que pudieran imitar la confirmación de la unión al receptor de IgE. Estos mimótopos podrían, presumiblemente, usarse para inducir anticuerpos policlonales que reaccionan con IgE nativa libre, pero no con IgE unida a receptor, así como para bloquear la unión de IgE a su receptor. Kriek y col. divulgaron mimótopos peptídicos que no son homólogos con ninguna parte de la molécula de IgE y, por tanto, son diferentes de los péptidos divulgados en la presente invención.

Como demuestra un estudio de la técnica, sigue existiendo una necesidad de potenciar la eficacia terapéutica de los procedimientos actuales para tratar o evitar trastornos tales como cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio o alergia. En particular, existe la necesidad de potenciar la función efectora, en particular, el efecto citotóxico de anticuerpos terapéuticos usados en el tratamiento de cáncer. El estado actual de la técnica es también insuficiente para tratar o evitar trastornos alérgicos (p. ej., mediante tratamiento con anticuerpos o tratamiento con vacunas).

3. Sumario

Los dominios extracelulares de FcγRIIA y FcγRIIB son un 95 % idénticos y, por tanto, comparten numerosos epítomos. Sin embargo, FcγRIIA y FcγRIIB muestran actividades muy diferentes. La diferencia fundamental es que el FcγRIIA inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tal como la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que el FcγRIIB inicia la señalización inhibitoria. Antes de esta invención, según el conocimiento de los autores, no se han identificado anticuerpos que distingan entre FcγRIIA humano nativo y FcγRIIB humano nativo expresados en células humanas, (véanse, Weinrich y col., *Hybridoma* 15(1996) 109-116; Micklem y col., *J. Immunol.* 6(1990) 2295-2303 y Budde y col., "Specificity of CD32 mAb for FcγRIIa, FcγRIIb1 and FcγRIIb2 expressed in transfected mouse B cells and BHK-21 cells", en: Schlossman y col., *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens* Oxford University Press, N.Y. (1995) 828-832). En vista de sus actividades y papel distintos en la modulación de las respuestas inmunitarias, tales anticuerpos que reconocen FcγRIIB humano nativo y FcγRIIA humano no nativo, son necesarios. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de dichos anticuerpos específicos de FcγRIIB humano nativo.

La invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a un anticuerpo de IgG aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente el dominio extracelular de FcγRIIB expresado de forma endógena en una célula humana con una afinidad al menos 10 veces mayor que con la que dicho dominio variable une FcγRIIA expresado de forma endógena en una célula humana, en el que dicha unión específica es a través del dominio variable. En realizaciones concretas, los anticuerpos de la invención compiten por unirse a FcγRIIB con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2B6, con número de acceso de ATCC PTA-4591 o con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 3H7, con número de acceso de ATCC PTA-4592. La invención también se refiere a un anticuerpo de IgG aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente el dominio extracelular de FcγRIIB humano expresado de forma endógena en una célula humana con una afinidad al menos 10 veces mayor que con la que dicho dominio variable une FcγRIIA expresado de forma endógena en una célula humana, en el que dicha unión específica es a través del dominio variable, dominio variable que bloquea la unión de un Fc de Ig a FcγRIIB y potencia la activación de linfocitos B, para su uso en el tratamiento del cáncer. La invención también se refiere a un anticuerpo de IgG aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente el dominio extracelular de FcγRIIB humano expresado de forma endógena en una célula humana con una afinidad al menos 10 veces mayor

que con la que dicho dominio variable une FcγRIIA expresado de forma endógena en una célula humana, en el que dicha unión específica es a través del dominio variable para su uso en una composición de vacuna, estando dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto frente a dicha composición de vacuna. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente pertinente de un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el presente documento se divulga un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, más particularmente, FcγRIIA humano nativo. Como se usa en el presente documento, "nativo" significa FcγRIIB o FcγRIIA que se expresa de forma endógena en la célula o se expresa de forma recombinante en una célula de mamífero pero no se expresa en una célula bacteriana o aislado y desnaturalizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIB con una afinidad al menos 2 veces mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. En otras realizaciones, el anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIB con una afinidad al menos 4 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10⁴, al menos 10⁵, al menos 10⁶, al menos 10⁷ o al menos 10⁸ veces mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. En una realización preferida, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIB con una afinidad 100 veces, 1000 veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces, 10⁶ veces, 10⁷ veces o 10⁸ veces mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. Preferentemente, estas afinidades de unión se determinan con la IgG monomérica y no con la IgG agregada y la unión es a través del dominio variable (p. ej., los fragmentos Fab tienen características de unión similares). En una realización, el anticuerpo divulgado en el presente documento no es el anticuerpo monoclonal denominado KB61, como se divulga en Pulford y col., 1986 *Immunology* 57: 71-76 o el anticuerpo monoclonal I18D2 divulgado en Weinrich y col., 1996, *Hybridoma* 15: 109-116. En otra realización específica, el anticuerpo divulgado en el presente documento no se une al mismo epítipo que y/o compite por la unión con KD61 o I18D2. Preferentemente, el anticuerpo divulgado en el presente documento no une la secuencia de aminoácidos SDPNFSI correspondiente a las posiciones 135 a 141 de la isoforma FcγRIIB2.

En el presente documento se divulga un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, determinado mediante cualquier procedimiento estándar conocido en la técnica para evaluar especificidades. La divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, determinado, por ejemplo, por transferencia de bandas western o radioinmunoensayo. La divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, determinado en un ensayo ELISA, en el intervalo lineal para la unión de FcγRIIB. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o a uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB, producido en un sistema de mamífero o bacteriano, con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, determinado en un ensayo ELISA.

En una realización concreta, la divulgación se refiere a un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA y el dominio constante de dicho anticuerpo posee además una afinidad potenciada por al menos uno o más receptores de Fc activadores. En otra realización específica más, dicho receptor de Fc activador es FcγRIII.

En una realización, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos bloquean el sitio de unión de IgG de FcγRIIB y bloquean la unión de IgG marcadas agregadas a FcγRIIB, por ejemplo, en un ensayo ELISA de bloqueo. En una realización concreta, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos bloquea la unión de IgG marcadas agregadas en un ensayo ELISA de bloqueo en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 %. En otra realización concreta más, el anticuerpo o uno de sus fragmentos bloquean completamente la unión de dicha IgG marcada agregada en dicho ensayo ELISA.

En otra realización, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos bloquean el sitio de unión de IgG de FcγRIIB y bloquean la unión de IgG marcada agregada a FcγRIIB, determinado mediante un ensayo de FACS de doble tinción.

La divulgación engloba el uso de anticuerpos que modulan (es decir, agonizan o antagonizan) la actividad de FcγRIIB. En una realización, los anticuerpos de la invención agonizan al menos una actividad de FcγRIIB, es decir, producen la señalización. Aunque sin pretender quedar ligados a ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas de la invención pueden imitar la agrupación de FcγRIIB, conduciendo a la amortiguación de la respuesta activadora frente a la unión de FcγR y la inhibición de la capacidad de respuesta celular.

En otra realización, los anticuerpos de la divulgación antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB, es decir, bloquean la señalización. Por ejemplo, los anticuerpos bloquean la unión de IgG agregadas a FcγRIIB.

La divulgación proporciona anticuerpos que inhiben la activación de mastocitos inducida por FcεRI. La divulgación proporciona además anticuerpos anti-FcγRIIB que inhiben la activación de macrófagos mediada por FcγRIIA en células monocíticas. La divulgación proporciona también anticuerpos anti-FcγRIIB que inhiben la señalización mediada por el receptor de linfocitos B.

En una realización particular, los anticuerpos anti-FcγRIIB bloquean el sitio de unión de ligando de FcγRIIB. En una realización específica más, la actividad de bloqueo puede bloquear la regulación negativa de la activación desencadenada por complejos inmunitarios y, en consecuencia, potenciar la respuesta inmunitaria. En otra realización específica, la respuesta inmunitaria potenciada es un incremento de la respuesta celular dependiente de anticuerpos. En una realización específica más, los anticuerpos anti-FcγRIIB bloquean el entrecruzamiento de los receptores de FcγRIIB con receptores de linfocitos B y/o de Fc, conduciendo a la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas o macrófagos.

La divulgación engloba la producción de anticuerpos monoclonales novedosos con especificidades por FcγRIIB en relación con FcγRIIA. En particular, la divulgación proporciona un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que unen específicamente FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos monoclonales unen FcγRIIA, en particular FcγRIIA humano, comprendiendo dicho procedimiento: a) inmunizar uno o más ratones transgénicos en FcγRIIA con FcγRIIB purificado o uno de sus fragmentos inmunogénicos; (b) producir líneas celulares de hibridoma a partir de células de bazo de dichos uno o más ratones; (c) rastrear dichas líneas celulares de hibridoma para localizar una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que los anticuerpos unen FcγRIIA. La divulgación engloba cualquier anticuerpo producido por dicho procedimiento. En una realización específica, la divulgación proporciona un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que unen específicamente FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos monoclonales unen FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, comprendiendo dicho procedimiento: a) inmunizar uno o más ratones transgénicos en FcγRIIA con FcγRIIB purificado o uno de sus fragmentos inmunogénicos; (b) reforzar la inmunización de dichos ratones durante un tiempo suficiente para producir una respuesta inmunitaria; (c) producir líneas celulares de hibridoma a partir de células de bazo de dichos uno o más ratones; (d) rastrear dichas líneas celulares de hibridoma para localizar una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que los anticuerpos unen FcγRIIA. En una realización preferida, dichos los ratones reciben inmunización de refuerzo al menos cuatro veces durante un periodo de cuatro meses. En una realización, dichos ratones se inmunizan con FcγRIIB purificado, que se ha mezclado con adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la respuesta inmunitaria en dichos ratones. En una realización concreta, dicho fragmento inmunogénico es el dominio extracelular soluble de FcγRIIB. Las líneas celulares de hibridoma se pueden rastrear usando técnicas estándar conocidas en la técnica (p. ej., ELISA).

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7, con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que compiten por la unión con el anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7 y unen FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, y/o se unen al mismo epítipo de FcγRIIB que el anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 2B6 o 3H7 y unen FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. Además, la divulgación proporciona una línea celular de hibridoma 2B6 o 3H7, con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente.

Los procedimientos divulgados en el presente documento engloban también polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la divulgación. En una realización, la divulgación proporciona una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. La divulgación también se refiere a un vector que comprende dicho ácido nucleico. La divulgación proporciona además un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, siendo dichas cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA. En una realización específica, dicho vector es un vector de expresión. La divulgación proporciona además células huésped que contienen los vectores de o polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. Preferentemente, la divulgación engloba polinucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos producidos por los clones de hibridoma depositados, con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, o partes de de ellas, p. ej., CDR, dominios variables, etc.

La divulgación proporciona además procedimientos para la producción de anticuerpos de la invención o sus fragmentos. Los anticuerpos divulgados en el presente documento o sus fragmentos pueden producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la producción de anticuerpos, en particular, mediante secreción a partir de células de hibridoma cultivadas, síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante conocidas en la técnica. En una realización específica, la divulgación se refiere a un procedimiento para producir de forma recombinante un anticuerpo específico para FcγRIIB, comprendiendo dicho procedimiento:

(i) cultivar bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo en un medio, una célula huésped que contiene una primera molécula de ácido nucleico, unida de manera operable a un promotor heterólogo y un segundo ácido nucleico unido de forma operable al mismo o a otro promotor heterólogo, codificando dichos primer y segundo ácidos nucleicos una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA; y

(ii) la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicho medio.

Preferentemente, los anticuerpos divulgados en el presente documento son anticuerpos monoclonales y, más preferentemente, anticuerpos humanizados o humanos. En una realización específica, los anticuerpos se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano. En otra realización específica, los anticuerpos reconocen específicamente o selectivamente uno o más epítomos de FcγRIIB. Otra realización de la divulgación engloba el uso de tecnología de presentación en fagos para incrementar la afinidad de los anticuerpos divulgados en el presente documento por FcγRIIB. Puede usarse cualquier procedimiento de rastreo conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidéz incrementada por FcγRIIB (p. ej., ELISA). En otra realización específica, los anticuerpos se rastrean usando ensayos de rastreo de anticuerpos bien conocidos en la técnica (p. ej., ensayos BIACORE) para identificar anticuerpos con un índice de K_{off} menor de $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento para detectar la presencia de FcγRIIB específicamente (es decir, FcγRIIB y no FcγRIIA) en una muestra biológica.

Los receptores de Fc activadores e inhibidores, p. ej., FcγRIIA y FcγRIIB, son críticos para la función equilibrada de estos receptores y las respuestas inmunitarias celulares adecuadas. La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento para el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de dicho equilibrio y control regulado en la ruta de señalización de los receptores de Fc. Por tanto, los anticuerpos frente a FcγRIIB de la divulgación tienen usos en la regulación de la respuesta inmunitaria, p. ej., en la inhibición de la respuesta inmunitaria en conexión con enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias o respuesta alérgica. Los anticuerpos de FcγRIIB de la divulgación también pueden usarse para modificar algunas funciones efectoras para potenciar, por ejemplo, la citotoxicidad mediada por anticuerpos terapéutica.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento son útiles para la evitar o tratar el cáncer, por ejemplo, en una realización, como tratamiento de agente único. En una realización, los anticuerpos son útiles para evitar o tratar neoplasias malignas de linfocitos B, particularmente linfoma no hodgkiniano o leucemia linfocítica crónica. En otra realización, los anticuerpos son útiles para tratar o evitar el cáncer, particularmente para potenciar la actividad citotóxica de anticuerpos terapéuticos específicos para antígenos cancerosos con actividad citotóxica para potenciar la destrucción de células tumorales y/o potenciar la actividad celular citotóxica dependiente de anticuerpos ("ADCC"), la actividad citotóxica dependiente del complemento ("CDC") o la fagocitosis de los anticuerpos terapéuticos. La divulgación proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno canceroso, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, y un segundo anticuerpo que une específicamente dicho antígeno canceroso y que es citotóxico. La divulgación proporciona también un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno canceroso, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que une específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos une FcγRIIA, y cuyo dominio constante tiene además una afinidad incrementada por uno o más receptores de Fc activadores, cuando el anticuerpo es monomérico, tal como FcγRIIIA, y un anticuerpo que une específicamente dicho antígeno canceroso y que es citotóxico. En una realización concreta, dicho receptor de Fc activador es FcγRIIIA.

En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para potenciar un efecto citotóxico mediado por anticuerpos en un sujeto que está siendo tratado con un anticuerpo citotóxico, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos, en una cantidad suficiente para potenciar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. En otra realización más, la divulgación proporciona un procedimiento para potenciar un efecto citotóxico mediado por anticuerpos en un sujeto que está siendo tratado con un anticuerpo citotóxico, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos, que además tiene una afinidad potenciada por un receptor de Fc activador, cuando es monomérico, en una cantidad suficiente para potenciar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. En otra realización más, la divulgación proporciona un procedimiento que comprende además la administración de uno o más tratamientos para el cáncer adicionales.

La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA; (ii) un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno canceroso; y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con cualquier anticuerpo terapéutico que media su efecto terapéutico a través de la destrucción de células para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. En una realización concreta, los anticuerpos potencian la actividad terapéutica del anticuerpo potenciando la función efectora mediada por anticuerpos. En otra realización de la invención, los

anticuerpos potencian la actividad terapéutica del anticuerpo citotóxico potenciando la fagocitosis y la opsonización de las células tumorales marcadas. En otra realización más, los anticuerpos potencian la actividad terapéutica del anticuerpo potenciado la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales diana.

5 En algunas realizaciones, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con un anticuerpo terapéutico que no media su efecto terapéutico a través de la destrucción de células para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. En una realización específica, la divulgación engloba el uso de anticuerpos en combinación con un anticuerpo terapéutico inductor de apoptosis con actividad agonista, p. ej., un anticuerpo anti-Fas. Los anticuerpos terapéuticos inductores de apoptosis pueden ser específicos para cualquier receptor de muerte conocido en la técnica para la modulación de rutas apoptóticas, p. ej., la familia de receptores TNFR.

10 La divulgación engloba usar los anticuerpos divulgados en el presente documento para bloquear la metástasis y la progresión de células tumorales mediada por macrófagos. Los anticuerpos son especialmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, donde se produce infiltración de macrófagos. Los anticuerpos antagonistas son especialmente útiles para controlar, p. ej., reducir o eliminar, la metástasis de células tumorales, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que se ubica en el sitio tumoral. La divulgación engloba además anticuerpos que deplecionan o eliminan de forma eficaz células efectoras inmunitarias distintas de macrófagos que expresan FcγRIIB, p. ej., células dendríticas. La depleción o eliminación eficaz de células efectoras inmunitarias usando los anticuerpos de la invención pueden variar desde una reducción de la población de células efectoras en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, preferentemente 90 % y lo más preferentemente 99 %.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento son especialmente útiles para el tratamiento de tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma. En algunas realizaciones, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con anticuerpos terapéuticos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos tumorales que no se expresan en las células tumorales mismas, sino en las células no malignas de apoyo del tumor, reactivas, circundantes, que comprenden el estroma tumoral. En una realización preferida, un anticuerpo divulgado en el presente documento se usa en combinación con un anticuerpo que une inmunoespecíficamente un antígeno tumoral en un fibroblasto, p. ej., la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

20 La divulgación proporciona un procedimiento para tratar un trastorno autoinmunitario en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento. La divulgación proporciona también un procedimiento para tratar un trastorno autoinmunitario en un paciente que lo necesita, comprendiendo además dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios y/o uno o más agentes inmunomoduladores.

25 La divulgación proporciona también un procedimiento para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento. La divulgación proporciona también un procedimiento para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo además dicho procedimiento administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios y/o uno o más agentes inmunomoduladores.

30 La divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria frente a una composición de vacuna en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcγRIIA, y una composición de vacuna, de modo que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos se administran en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria frente a dicha composición de vacuna en dicho sujeto. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse para potenciar una respuesta humoral y/o mediada por células frente al/a los antígeno(s) de la composición de vacuna. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con cualquier vacuna conocida en la técnica. La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento para evitar o tratar un trastorno concreto, donde una respuesta inmunitaria potenciada frente a un antígeno o antígenos concretos es eficaz para tratar o evitar la enfermedad o trastorno.

35 La divulgación también proporciona un procedimiento para potenciar el tratamiento inmunitario para un agente infeccioso en el que los anticuerpos divulgados en el presente documento se administran a un paciente que ya está infectado por un patógeno, tal como VIH o VHS, para potenciar la opsonización y la fagocitosis de las células infectadas.

40 La divulgación proporciona un procedimiento para tratar enfermedades con señalización mediada por apoptosis deficiente, p. ej., cáncer, enfermedad autoinmunitaria. En una realización específica, la invención engloba un procedimiento para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, comprendiendo dicho procedimiento administrar un anticuerpo divulgado en el presente documento en combinación con un anticuerpo anti-

Fas.

En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende: (i) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención; y (ii) detectar la unión de dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos, en el que la detección de dicho marcador detectable por encima de un nivel de base o estándar indica que dicho sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria.

La divulgación proporciona además un procedimiento para tratar o evitar un trastorno alérgico mediado por IgE en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos antagonistas divulgados en el presente documento. La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar o evitar un trastorno alérgico mediado por IgE en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con otros anticuerpos terapéuticos o composiciones de vacuna usados para tratar o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE.

3.1 Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresión "un específicamente FcγRIIB" y expresiones análogas se refieren a anticuerpos o sus fragmentos que se unen específicamente a FcγRIIB o uno de sus fragmentos y no se unen específicamente a otros receptores de Fc, en particular a FcγRIIA. Además, se entiende por un experto en la técnica, que un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB, puede unirse a través del dominio variable o el dominio constante del anticuerpo. Si el anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB se une a través de su dominio variable, se entiende por un experto en la técnica que no está agregado, es decir, es monomérico. Un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad más baja, determinado, p. ej., mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, los anticuerpos o sus fragmentos que se unen específicamente a FcγRIIB o uno de sus fragmentos no presentan reacción cruzada con otros antígenos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a FcγRIIB pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Un anticuerpo o uno de sus fragmentos se unen específicamente a un FcγRIIB cuando se unen a FcγRIIB con una afinidad más alta que a cualquier antígeno de reacción cruzada, determinado usando técnicas experimentales, tales como transferencias de bandas western, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Véase, p. ej., Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology segunda edición, Raven Press, Nueva York en las páginas 332-336 para un análisis sobre la especificidad de los anticuerpos.

Como se usan en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej. anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualesquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado" como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o proteína que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, p. ej., por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Un polipéptido o proteína derivados pueden producirse por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado o un derivado de proteína posee una función similar o idéntica a la del polipéptido o proteína a partir del cual se derivó.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteínico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica, que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero no se limita a, una molécula modificada, p. ej., mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amino. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Como se usan en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto. En particular, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno autoinmunitario" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto frente a sus propias células, tejidos

y/u órganos. La expresión "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por la inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con la inflamación. Además, la inflamación puede o no ser provocada por un trastorno autoinmunitario. Así, algunos trastornos pueden caracterizarse como trastornos autoinmunitarios y trastornos inflamatorios.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o un tumor resultantes de un crecimiento incontrolado anormal de células. Como se usa en el presente documento, cáncer incluye explícitamente, leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras vecinas del organismo y se ha diseminado a sitios alejados. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno canceroso específico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunomodulador" y sus variaciones incluyendo, pero sin limitarse a, agentes inmunomoduladores, se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En algunas realizaciones distintas, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína que tiene actividad antigénica o inmunogénica, preferentemente en un mamífero, y lo más preferentemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que produce una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo, determinado mediante cualquier procedimiento bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no tienen que ser necesariamente inmunogénicos.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido mantiene al menos una función del polipéptido.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (p. ej., ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, inosina o bases tritiladas. Tales análogos pueden comprender también moléculas de ADN o ARN que comprenden esqueletos modificados que proporcionan atributos beneficiosos a las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada para atravesar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de una hebra, de dos hebras, pueden contener porciones tanto de una hebra como de dos hebras y pueden contener porciones de tres hebras, pero preferentemente es ADN de doble hebra.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad o trastorno asociado con FcγRIIB y cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de regulación en la ruta de señalización del receptor de Fc o para potenciar la eficacia terapéutica de otro tratamiento, p. ej., un anticuerpo terapéutico, un tratamiento de vacuna, etc. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de la enfermedad, p. ej., retardar o minimizar la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse también a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento o el control de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento o el control de una enfermedad, p. ej., suficiente para potenciar la eficacia terapéutica de un anticuerpo terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de anticuerpo frente a FcγRIIB divulgado en el presente documento, el término puede englobar una cantidad que mejora el tratamiento en general, reduce o evita efectos no deseados o potencia la eficacia terapéutica de o establece sinergia con otro agente terapéutico.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente(s) que puede usarse para evitar un trastorno, o para evitar la recidiva o la diseminación de un

trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para evitar la recidiva o diseminación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de ella en un paciente, incluyendo, pero sin limitarse a aquellos predispuestos a una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos genéticamente predispuestos al cáncer o expuestos anteriormente a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse también a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico para el tratamiento o el control de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio para evitar la enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de anticuerpo frente a FcγRIIB divulgado en el presente documento, la expresión puede englobar una cantidad que mejora la profilaxis general o potencia la eficacia profiláctica de o establece sinergia con otro agente profiláctico, tal como, pero sin limitarse a un anticuerpo terapéutico.

Como se usan en el presente documento, los términos "evitar", "que evita" y "para evitar" se refieren a evitar la recidiva o la aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no restringe el orden en que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Un primer agente terapéutico o profiláctico puede administrarse antes de (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), simultáneamente con o posteriormente a (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo agente terapéutico o profiláctico a un sujeto con un trastorno.

4. Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1: Unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 3H7 a FcγRIIB y FcγRIIA.

- A Las uniones directas de anticuerpos de algunos de los cultivos de hibridoma a los FcγRII se compararon con un anticuerpo anti-FcγRII comercialmente disponible en un ensayo ELISA donde la placa se recubrió con los receptores. Se incubaron distintas diluciones (1:10) de los sobrenadantes en la placa. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra y se monitorizó la absorbancia a 650 nm.
- B Las uniones directas del anticuerpo del cultivo de hibridoma 3H7 (sobrenadante n.º 7 de la figura 1A), en bruto (panel izquierdo) y en forma purificada (panel derecho), a FcγRIIA y FcγIIB, se compararon usando el mismo ensayo ELISA que en 1A.

FIGURA 2: Competición en la unión a FcγRIIB del anticuerpo producido a partir del hibridoma 3H7 e IgG humana biotinizada agregada.

La capacidad del anticuerpo de 3H7 para competir con IgG humana biotinizada agregada por la unión a FcγRIIB se midió usando un experimento ELISA de bloqueo.

La placa de ELISA recubierta con FcγIIB se incubó con el sobrenadante que contenía el anticuerpo de 3H7 y con un sobrenadante de las mismas células de hibridoma pero que no contenía anticuerpo (control negativo).

Después, se añadieron a la placa distintas diluciones (1:3) partiendo de 200 ng/pocillo, de IgG humana biotinizada agregada y los agregados unidos se detectaron con conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, la reacción se reveló con TMB y se motorizó la absorbancia a 650 nm.

FIGURA 3: Comparación de la unión directa del anticuerpo de 3H7 a FcγRIIB producido en un sistema bacteriano o de mamífero.

La unión directa del anticuerpo de 3H7 a FcγRIIB se midió usando un ensayo ELISA. Se comparó la unión al FcγRIIB producido en bacterias o en mamíferos. La valoración de anticuerpos comenzó desde el sobrenadante puro, seguido por diluciones 1:10. El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra, la reacción se reveló con TMB y se monitorizó la absorbancia a 650 nm.

FIGURA 4: Unión directa del anticuerpo de 3H7 a FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA.

Las uniones directas del anticuerpo de 3H7 purificado a FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA expresados en un sistema de mamífero se compararon usando el ensayo ELISA. La placa de ELISA se recubrió con los tres receptores (100 ng/pocillo). Se incubaron diferentes diluciones del anticuerpo de 3H7 purificado en la placa recubierta. Un anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra se usó para la detección del anticuerpo específico unido, la reacción se reveló con TMB y se monitorizó la absorbancia a 650 nm.

FIGURA 5: Comparación de la capacidad de unión directa a FcγRIIA y FcγRIIB del anticuerpo purificado a partir del clon 2B6 comparado con otros tres anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles frente a FcγRII.

5 La unión de anticuerpo de 2B6 a FcγRIIA (panel superior derecho) y FcγRIIB (panel superior izquierdo) se compara con la de otros tres anticuerpos comercialmente disponibles obtenidos frente a FcγRII. El formato de ELISA usado es el mismo descrito en la figura 4.

FIGURA 6: Competición en la unión del anticuerpo producido a partir del clon 2B6 e IgG humana biotinilada agregada a FcγRIIB.

Panel A

10 La capacidad del anticuerpo presente en el sobrenadante del clon 2B6 para competir por la unión a FcγRIIB con IgG humana biotinilada agregada se midió usando un experimento ELISA de bloqueo.

La capacidad de competición del anticuerpo de 2B6 se comparó con la de un sobrenadante negativo de hibridoma y con la del anticuerpo de 3H7.

15 Se incubó una placa de ELISA recubierta con FcγRIIB con diferentes diluciones (1:10) de los sobrenadantes. Tras los lavados la placa se incubó con una cantidad fija de IgG humana biotinilada agregada (1 mg/pocillo) y los agregados unidos se detectaron con conjugado estreptavidina-HRP. La reacción se reveló con TMB y se monitorizó la absorbancia a 650 nm.

Panel B

20 El mismo ELISA de bloqueo descrito en el panel A se realizó con anticuerpo de 2B6 purificado y se representaron los datos de una concentración de anticuerpo de bloqueo usada (4 mg/pocillo) en un diagrama de barras. La capacidad de 2B6 para bloquear la unión de IgG humana agregada a FcγRIIB se comparó con la de un control de isotipo de IgG1 de ratón.

FIGURA 7: Competición del anticuerpo de 2B6 y la IgG humana biotinilada agregada en la unión a FcγRIIB usando un ensayo de FACS de tinción doble.

25 Se realizó un ensayo de FACS de tinción doble para caracterizar el anticuerpo de 2B6 usando células CHO-K1 que habían sido transfectadas de forma estable con FcγRIIB de mamífero de longitud completa.

Panel A

Las células transfectantes se tiñeron con control de isotipo de IgG1 de ratón seguido por un anticuerpo conjugado con FITC anti-ratón de cabra y estreptavidina-PE.

30 Panel B

Las células transfectantes se tiñeron con IgG humana biotinilada agregada después de ser teñidas con control de isotipo de IgG1 de ratón y marcadas con un anticuerpo conjugado con FITC anti-ratón de cabra para detectar el anticuerpo monoclonal unido y con conjugado estreptavidina-PE para detectar los agregados unidos.

Panel C

35 Las células se tiñeron con anticuerpo de 2B6, el anticuerpo se retiró por lavado y las células se incubaron con IgG humana biotinilada agregada. Las células se lavaron y se marcaron con un anticuerpo conjugado con FITC anti-ratón de cabra para detectar el anticuerpo monoclonal unido y con conjugado estreptavidina-PE para detectar los agregados unidos.

FIGURA 8: Co-tinción de anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB y CD20 de linfocitos B humanos.

40 Se tiñeron células de sangre humana ("capa leucocítica") con anticuerpo conjugado con FITC anti-CD20, para seleccionar la población de linfocitos B, así como de 3H7 y 2B6. Los anticuerpos anti-FcγRIIB se detectaron con anticuerpo conjugado con PE anti-ratón de cabra.

A. Las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD20-FITC y control de isotipo de IgG1 de ratón.

B. Las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD20-FITC y anticuerpo de 3H7.

45 C. Las células se co-tiñeron con anticuerpo anti-CD20-FITC y anticuerpo de 2B6.

FIGURA 9: Tinción de células CHO que expresan FcγRIIB.

A. Se tiñeron células CHO/IIB con control de isotipo de IgG1 de ratón (panel izquierdo) y anticuerpo de 3H7

(panel derecho).

B. Se tiñeron células CHO/IIB con control de isotipo de IgG1 de ratón (panel izquierdo) y anticuerpo de 2B6 (panel derecho).

Los anticuerpos unidos a células se marcaron con un anticuerpo conjugado con PE anti-ratón de cabra.

5 **FIGURA 10: Ensayo de liberación de β -hexosaminidasa.**

10 A. Representación esquemática del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa. Los transfectantes que expresaban Fc γ RIIB humano fueron sensibilizados con IgE y expuestos a fragmentos F(ab')₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal para agregar Fc ϵ RI. El entrecruzamiento se produce debido a la capacidad del anticuerpo policlonal para reconocer la cadena ligera del anticuerpo de IgE murina unido a Fc ϵ RI. Los transfectantes sensibilizados con IgE murina y preincubados con anticuerpo de 2B6 también fueron expuestos a fragmentos F(ab')₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal para entrecruzar Fc ϵ RI con Fc γ RIIB.

B. Liberación de β -hexosaminidasa inducida por F(ab)₂ anti-ratón de cabra en células RBL-2H3 que expresan Fc γ RIIB humano. La actividad β -hexosaminidasa liberada se expresa como porcentaje de la actividad liberada con relación a la actividad total.

15 **FIGURA 11: Líneas celulares de carcinoma de ovario y de mama expresan Her2/neu en distintos niveles.**

Tinción de A) IGROV-1 de ovario con ch4D5 purificado, B) OVCAR-8 de ovario con anticuerpo 4D5 purificado y C) células SKBR-3 de cáncer de mama con ch4D5 purificado seguida de anti-humano de cabra conjugado con ficoeritrina (PE). El isotipo de control de IgG1 pertinente se indica a la izquierda de la tinción con anticuerpo anti-Her2neu.

20 **FIGURA 12: Los monocitos elutriados expresan todos los Fc γ R:**

A. MDM obtenidos del donante 1,

B. MDM obtenidos del donante 2; propagados en suero humano o suero humano y GMCSF

C. Monocitos descongelados y teñidos inmediatamente.

25 Se tiñeron macrófagos derivados de monocitos con anticuerpos específicos frente a receptor Fc γ R humano. El diagrama de puntos oscuros de cada gráfica representa la tinción de base. El diagrama de puntos claros dentro de cada panel representa la tinción con anticuerpos anti-Fc γ R humano específicos.

30 **FIGURA 13: Ch4D5 media la ADCC eficaz con líneas celulares de cáncer de ovario y de mama usando PBMC.**

Se muestra la lisis específica sustraída de la lisis independiente de anticuerpos para A) la línea celular tumoral de ovario, IGROV-1 en una proporción efector:diana de 75:1, y para B) la línea celular tumoral SKBR-3 en una proporción efector:diana de 50:1 con diferentes concentraciones de ch4D5 como se indica.

35 **FIGURA 14: La tinción histoquímica de ascitis de ovario humana muestra células tumorales y otras células inflamatorias.**

A). Tinción H y E en ascitis de una paciente con tumor de ovario. Pueden identificarse tres células neoplásicas por el tamaño y la forma irregulares, el citoplasma disperso y núcleos de densidad irregular. B). La tinción de Giemsa de ascitis no procesada de una paciente con un tumor seroso del ovario muestra dos células mesoteliales situadas juntas indicadas con flechas cortas. También se muestra un agrupamiento de cinco células epiteliales malignas indicado por la flecha larga. Pueden verse eritrocitos en el fondo. C). Tinción de Giemsa de otra paciente con tumor seroso del ovario que indica un agrupamiento de células compuesto por células mesoteliales, linfocitos y células epiteliales neoplásicas (flecha).

5. Descripción de las realizaciones preferidas

40 **5.1 Anticuerpos específicos frente a Fc γ RIIB**

La divulgación engloba anticuerpos (preferentemente anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos que unen específicamente Fc γ RIIB, preferentemente Fc γ RIIB humano, más preferentemente Fc γ RIIB humano nativo, con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen Fc γ RIIA, preferentemente, Fc γ RIIA humano, más preferentemente Fc γ RIIA humano nativo. Preferentemente, los anticuerpos divulgados en el presente documento unen el dominio extracelular de Fc γ RIIB humano nativo. En algunas realizaciones, los anticuerpos o sus fragmentos se unen a Fc γ RIIB con una afinidad mayor de dos veces, cuatro veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces, 10⁶ veces, 10⁷ veces o 10⁸ veces que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen Fc γ RIIA. En una realización concreta, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7, con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas que producen anticuerpos de la invención se han depositado en la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110) el 13 de agosto de 2002, con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en materia de

Patentes, y con números de acceso concedidos PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. En una realización específica, la divulgación engloba un anticuerpo cuya cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y cuya cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, los anticuerpos divulgados en el presente documento son humanos o han sido humanizados, preferentemente una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6. En otra realización preferida más, los anticuerpos divulgados en el presente documento no unen receptores de Fc activadores, p. ej., FcγIIIA, FcγIIIB, etc.

En una realización concreta, los anticuerpos divulgados en el presente documento, o sus fragmentos, agonizan al menos una actividad FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento inhiben la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, la entrada de calcio intracelular de linfocitos B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de señalización corriente abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización más, los anticuerpos agonistas potencian la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En otra realización, los anticuerpos agonistas inhiben la actividad MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los anticuerpos agonistas agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización concreta, dichos anticuerpos inhiben la activación de mastocitos inducida por FcεI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los anticuerpos agonistas estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc o inhiben la activación de miembros de la familia de las MAP cinasas (p. ej., Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los anticuerpos agonistas potencian la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los anticuerpos agonistas inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra realización, los anticuerpos divulgados en el presente documento o sus fragmentos antagonizan al menos una actividad FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En una realización concreta, los anticuerpos antagonistas potencian la actividad de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, la entrada de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización corriente abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización concreta más, los anticuerpos antagonistas reducen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En otra realización, los anticuerpos antagonistas potencian la actividad MAP cinasa o el reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los anticuerpos antagonistas antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una realización concreta, los anticuerpos antagonistas potencian la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los anticuerpos antagonistas inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, potencian la activación de miembros de la familia de las MAP cinasas (p. ej., Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los anticuerpos antagonistas inhiben la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los anticuerpos antagonistas potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra realización, los anticuerpos antagonistas evitan la fagocitosis, la eliminación de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), intracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos usados en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicha molécula de inmunoglobulina se une a FcγRIIA.

Los anticuerpos usados en los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos (p. ej., humano, de primate no humano, murino, de burro, de oveja, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo). Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de colecciones de de inmunoglobulinas humanas o colecciones de secuencias codificantes de inmunoglobulinas humanas sintéticas o a partir de ratones que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

Los anticuerpos usados los procedimientos divulgados en el presente documento pueden ser mono-específicos, bi-específicos, tri-específicos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse inmunoespecíficamente a diferentes epítopos de FcγRIIB o unirse inmunoespecíficamente tanto a un epítipo de FcγRIIB como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material sólido de soporte. Véanse, p. ej., las publicaciones internacionales N.º WO 93/17715, WO 92/08802; WO 91/00360 y WO 92/05793; Tutt, y col., 1991, J. Immunol. 147:50-59; las patentes de EE. UU. N.º 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920 y 5.601.819; y Kostelny y col., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Todorovska y col., 2001, Journal of Immunological Methods,

248:47-66.

5 En realizaciones concretas, los anticuerpos divulgados en el presente documento son multiespecíficos con especificidades por FcγRIIB y por un antígeno canceroso o cualquier otro marcador de superficie celular específico para una célula diseñada para ser destruida, p. ej., para tratar o evitar una determinada enfermedad o trastorno, o por otros receptores de Fc, p. ej., FcγRIIIA, FcγRIIIB, etc.

10 En una realización específica, un anticuerpo usado en los procedimientos divulgados en el presente documento es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno (p. ej., que comprende una o más regiones de determinación de la complementariedad (CDR), preferentemente las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente (p. ej. la CDR3 de la cadena pesada).
 15 En otra realización, un anticuerpo usado en los procedimientos divulgados en el presente documento se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCCPTA-4591 y PTA-4592, respectivamente y/o compete con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, determinado p. ej., en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo adecuado y también une FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos une FcγRIIA.

20 Los anticuerpos usados en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo tal como un enlace covalente. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

25 Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos de presentación en fagos descritos anteriormente usando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes de EE. UU. N.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones internacionales N.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 30 91/10741.

35 También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no son capaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, los complejos de genes humanos de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas, además de los genes de cadena ligera y pesada humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región J_H evita la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias 40 modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan usando metodologías convencionales con un antígeno seleccionado, p. ej., la totalidad o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los 45 transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y posteriormente experimentan un cambio de clase y mutación somática. Así, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, p. ej., las publicaciones internacionales N.º WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las patentes de EE. UU. N.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Además, pueden contratarse empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra un 55 antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

60 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi y col., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies y col., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y las patentes de EE. UU. N.º 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397. Pueden producirse anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie

no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (en el documento EP 239.400; publicación internacional N.º WO 91/09967; y en las patentes de EE. UU. N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), barnizado o modificación de la superficie (en los documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, *Protein Engineering* 7:805; y Roguska y col., 1994, *PNAS* 91:969) y reordenamiento de cadenas (en la patente de EE. UU. N.º 5.565.332).

Frecuentemente, los residuos estructurales de las regiones estructurales serán sustituidos por el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., realizando un modelo de las interacciones de los residuos estructurales y de las CDR para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales no habituales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.585.089; y Riechmann y col., 1988, *Nature* 332:323.)

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o variantes, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región estructural que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos, al menos uno y normalmente dos, los dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Normalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Habitualmente, el dominio constante es un dominio constante que fija el complemento cuando se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, y la clase es normalmente IgG₁. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de clase IgG₂. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo y la selección de dominios constantes concretos para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la técnica. Las regiones estructurales y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen que corresponderse exactamente con las secuencias originales, p. ej., la CDR del donante o la estructura consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un residuo, de forma que el residuo de CDR o estructural en ese sitio no se corresponde con el anticuerpo de consenso o importado. No obstante, tales mutaciones, no serán extensas. Habitualmente, al menos el 75 % de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de la región estructural (FR) y las secuencias CDR originales, más a menudo el 90 % y lo más preferentemente, más del 95 %. Los anticuerpos humanizados pueden prepararse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, injerto de CDR (en la patente europea N.º EP 239.400; en la publicación internacional N.º WO 91/09967; y en las patentes de EE. UU. N.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), barnizado o modificación de la superficie (en las patentes europeas N.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka y col., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska y col., 1994, *PNAS* 91:969-973), reordenamiento de cadenas (en la patente de EE. UU. N.º 5.565.332) y técnicas divulgadas, p. ej., en las patentes de EE. UU. N.º 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, la publicación internacional N.º WO 9317105, Tan y col., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas y col., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea y col., 2000, *Methods* 20:267-79, Baca y col., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska y col., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto y col., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Sup):5973s-5977s, Couto y col., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen y col., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones y col., 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann y col., 1988, *Nature* 332:323 y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. A menudo, los residuos estructurales de las regiones estructurales serán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., realizando un modelo de las interacciones de los residuos estructurales y de las CDR para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos estructurales no habituales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.585.089; y Riechmann y col., 1988, *Nature* 332:323).

Además, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos antiidiotípicos usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (véanse, p. ej., Greenspan y Bona, 1989, *FASEB J.* 7:437-444; y Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147:2429-2438). La divulgación proporciona procedimientos que emplean el uso de polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos.

La divulgación engloba anticuerpos de un sólo dominio, incluyendo anticuerpos camelizados de dominio único (véanse, p. ej., Muldermans y col., 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Nuttall y col., 2000, *Actual. Pharm. Biotech.* 1:253; Reichmann y Muldermans, 1999, *J. Immunol. Met.* 231:25; las publicaciones internacionales N.º WO 94/04678 y WO 94/25591; la patente de EE. UU. N.º 6.005.079). En una realización, la divulgación proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios VH con modificaciones tales que se forman anticuerpos de dominio

único.

Los procedimientos divulgados en el presente documento engloban también el uso de anticuerpos o sus fragmentos que tienen semividas (p. ej., semividas en suero) en un mamífero, preferentemente un ser humano, de más de 15 días, preferentemente de más de 20 días, de más de 25 días, de más de 30 días, de más de 35 días, de más de 40 días, de más de 45 días, de más de 2 meses, de más de 3 meses, de más de 4 meses o de más de 5 meses. Las semividas incrementadas de los anticuerpos o sus fragmentos en un mamífero, preferentemente un ser humano, dan como resultado una mayor valoración en suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en el mamífero y, por tanto, reducen la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o reducen la concentración que debe administrarse de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos o sus fragmentos que tienen semividas *in vivo* incrementadas pueden generarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos o sus fragmentos con semividas *in vivo* incrementadas pueden generarse modificando (p. ej., por sustitución, delección o adición) residuos de aminoácido identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. Los anticuerpos pueden manipularse mediante procedimientos descritos en Ward y col. para incrementar sus semividas biológicas (véase el documento US 6.277.375 B1). Por ejemplo, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden manipularse en el dominio Fc-bisagra para que tengan semividas *in vivo* o en suero incrementadas.

Los anticuerpos o sus fragmentos con semividas *in vivo* incrementadas pueden generarse uniendo a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo moléculas de polímero, tal como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. El PEG puede unirse a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional, bien mediante conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o mediante grupos épsilon-amino presentes en residuos de lisina. Se usará la derivatización polimérica lineal o ramificada que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se monitorizará estrechamente mediante SD-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG con los anticuerpos. El PEG sin reaccionar puede separarse de los conjugados PEG-anticuerpo mediante, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden modificarse mediante los procedimientos y agentes de acoplamiento descritos por Davis y col. (véase el documento US 4.179.337) con el fin de proporcionar composiciones que pueden inyectarse en el aparato circulatorio de mamíferos sustancialmente sin respuesta inmunogénica.

La divulgación también engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento con mutaciones (p. ej., una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones estructurales o variables. Preferentemente, las mutaciones de estos anticuerpos mantienen o potencian la avidéz y/o la afinidad de los anticuerpos por el/los antígeno(s) concretos a los que se unen inmunoespecíficamente. Pueden usarse las técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica (p. ej., inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno concreto.

La divulgación engloba anticuerpos que comprenden modificaciones, preferentemente en la región Fc, que modifican la afinidad de unión del anticuerpo a uno o más FcγR. Se conocen en la técnica procedimientos para modificar anticuerpos con unión modificada a uno o más FcγR, véanse, p. ej., las publicaciones PCT N.º WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089 y las patentes de EE. UU. N.º 5.843.597 y 5.642.821. La divulgación engloba cualquiera de las mutaciones divulgadas en las solicitudes de EE. UU. N.º 60/439.498, presentada el 9 de enero de 2003, y 60/456.041, presentada el 19 de marzo de 2003. En algunas realizaciones, la divulgación engloba anticuerpos que tienen modificada su afinidad por un FcγR activador, p. ej., FcγRIIIA. Preferentemente, tales modificaciones tienen también una función efectora mediada por Fc modificada. Las modificaciones que afectan a la función efectora mediada por Fc son bien conocidas en la técnica (véase el documento US 6.194.551). Los aminoácidos que pueden modificarse de acuerdo con el procedimiento divulgado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a prolina 329, prolina 331 y lisina 322. Las prolinas 329 y 331 y la lisina 322 se reemplazan preferentemente con alanina, aunque se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido. Véanse la publicación internacional N.º WO 00/42072 y el documento US 6.194.551.

En una realización concreta, la modificación de la región Fc comprende una o más mutaciones en la región Fc. La una o más mutaciones en la región Fc pueden dar como resultado un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpo modificada, una unión a otros receptores de Fc modificada (p. ej., receptores de Fc activadores), una actividad ADCC modificada, una actividad de unión a C1q modificada o una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento modificada o cualquiera de sus combinaciones.

La divulgación también proporciona anticuerpos con contenido en oligosacáridos modificado. Oligosacáridos como se usa en el presente documento se refiere a hidratos de carbono que contienen dos o más monosacáridos y los dos términos pueden utilizarse indistintamente en el presente documento. Los restos de carbohidrato divulgados en el presente documento se describirán con referencia a la nomenclatura usada comúnmente en la técnica. Para una revisión de la química de los hidratos de carbono, véase, p. ej., Hubbard y col., 1981 Ann. Rev. Biochem., 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man que representa manosa; GlcNAc que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa y Glc para glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la

notación abreviada NeuNAc para el ácido 5-N-acetilneuramínico y NeuNGc para el ácido 5-glicolilneuramínico.

En general, los anticuerpos contienen restos de carbohidrato en posiciones conservadas de la región constante de la cadena pesada y hasta el 30 % de las IgG humanas tienen una región Fab glucosilada. La IgG tiene una sola estructura de carbohidrato batenaria unida a N en Asn 297 que reside en el dominio CH2 (Jefferis y col., 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59-76; Wright y col., 1997, *Trends Biotech* 15: 26-32). La IgG humana tiene normalmente un carbohidrato con la siguiente estructura: GlcNAc(fucosa)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)₂. No obstante, entre las IgG se producen variaciones en el contenido en hidratos de carbono, lo que conduce a una función modificada, véanse, p. ej., Jassal y col., 2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 243-9; Groenink y col., 1996 *J. Immunol.* 26: 1404-7; Boyd y col., 1995 *Mol. Immunol.* 32: 1311-8; Kumpel y col., 1994, *Human Antibody Hybridomas*, 5: 143-51. La divulgación engloba anticuerpos que comprenden una variación en el resto carbohidrato que está unido a la Asn 297. En una realización, el resto carbohidrato tiene una galactosa y/o una galactosa-ácido siálico en uno o en ambos de los GlcNAc terminales y/o un tercer brazo GlcNAc (GlcNAc bisector).

En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento están sustancialmente libres de uno o más grupos de azúcar seleccionados, p. ej., uno o más residuos de ácido siálico, uno o más residuos de galactosa, uno o más residuos de fucosa. Un anticuerpo que está sustancialmente libre de uno o más grupos de azúcar seleccionados puede prepararse usando procedimientos comunes conocidos por el experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, producir por recombinación un anticuerpo en una célula huésped que es defectiva en la adición del/de los grupo(s) de azúcar seleccionado(s) al resto carbohidrato del anticuerpo, de forma que aproximadamente el 90-100 % del anticuerpo de la composición carece del/de los grupo(s) de azúcar unido(s) al resto carbohidrato. Los procedimientos alternativos para la preparación de tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, el cultivo de células bajo condiciones que evitan o reducen la adición de uno o más grupos de azúcar seleccionados o la eliminación postraduccional de uno o más grupos de azúcar seleccionados.

En una realización específica, la divulgación engloba un procedimiento para producir una preparación de anticuerpos sustancialmente homogénea, en la que aproximadamente el 80-100 % del anticuerpo de la composición carece de fucosa en su resto carbohidrato, p. ej., la unión de carbohidrato de la Asn 297. El anticuerpo puede prepararse, por ejemplo, mediante (a) el uso de una célula huésped manipulada que es deficiente en el metabolismo de la fucosa de forma que tiene una capacidad reducida para fucosilar proteínas expresadas en ella; (b) el cultivo de células bajo condiciones que evitan o reducen la fucosilación; (c) la eliminación postraduccional de fucosa, p. ej., con una enzima fucosidasa; o (d) la purificación del anticuerpo con el fin de seleccionar para el producto el que no está fucosilado. Lo más preferentemente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado se expresa en una célula huésped que tiene una capacidad reducida para fucosilar el anticuerpo expresado en ella. Preferentemente, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en dihidrofolato reductasa, p. ej., una célula CHO Lec 13 (línea celular de CHO resistente a lectina; Ribka y Stanley, 1986, *Somatic Cell & Molec. Gen.* 12 (1): 51-62; Ripka y col., 1986, *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (2): 533-45), CHO-K1, DUX-B 11, CHO-DP12 o CHO-DG44, que ha sido modificada de forma que el anticuerpo, sustancialmente, no se fucosila. Por tanto, la célula puede presentar una expresión y/o una actividad modificadas para la enzima fucosiltransferasa u otra enzima o sustrato implicados en la adición de fucosa al oligosacárido unido en N, de forma que la enzima tiene una actividad disminuida y/o un nivel de expresión en la célula reducido. Para procedimientos para preparar anticuerpos con un contenido en fucosa modificado, véanse, p. ej., el documento WO 03/035835 y Shields y col., 2002, *J. Biol. Chem.* 271 (30): 26733-40.

En algunas realizaciones, las modificaciones de hidratos de carbono modificadas modulan uno o más de los siguientes: solubilización del anticuerpo, facilitación del transporte subcelular y secreción del anticuerpo, promoción del ensamblaje del anticuerpo, integridad conformacional y función efectora mediada por anticuerpos. En una realización específica, las modificaciones de hidratos de carbono modificadas potencian la función efectora mediada por anticuerpos en relación con el anticuerpo que carece de modificación de hidratos de carbono. Las modificaciones de hidratos de carbono que conducen a una modificación de la función efectora mediada por anticuerpos son bien conocidas en la técnica (p. ej., véanse Shields R.L. y col., 2001, *J. Biol. Chem.* 271 (30): 26733-40; Davies J. y col., 2001, *Biotechnology & Bioengineering*, 74(4): 288-294). En otra realización específica, las modificaciones de hidratos de carbono modificadas potencian la unión anticuerpos de la invención al receptor FcγRIIB. Modificar las modificaciones de carbohidratos de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento incluye, por ejemplo, incrementar el contenido en hidratos de carbono del anticuerpo o reducir el contenido en hidratos de carbono del anticuerpo. Los procedimientos para modificar los contenidos en hidratos de carbono son conocidos por los expertos en la técnica, véanse, p. ej., Wallick y col., 1988, *Journal of Exp. Med.* 168 (3): 1099-1109; Tao y col., 1989 *Journal of Immunology*, 143(8): 2595-2601; Routledge y col., 1995 *Transplantation*, 60(8): 847-53; Elliott y col. 2003; *Nature Biotechnology*, 21: 414-21; Shields y col. 2002 *Journal of Biological Chemistry*, 277(30): 26733-40

En algunas realizaciones, la divulgación engloba anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glucosilación, de modo que uno o más restos de carbohidrato se unen covalentemente al anticuerpo. En otras realizaciones, la divulgación engloba anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glucosilación y una o más modificaciones en la región Fc, tales como las divulgadas anteriormente y las conocidas por el experto en la técnica. En realizaciones preferidas, las una o más modificaciones en la región Fc potencian la afinidad del anticuerpo por un FcγR activador, p. ej., FcγRIIIA, en relación con el anticuerpo que comprende las regiones Fc naturales. Los anticuerpos divulgados en el presente documento con uno o más sitios de glucosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpos potenciada, p. ej., una actividad ADCC potenciada. En algunas

realizaciones, la divulgación comprende además anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe que interactúan directamente o indirectamente con un resto de carbohidrato del anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, los aminoácidos de las posiciones 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directamente o indirectamente con un resto de carbohidrato de un anticuerpo son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Jefferis y col., 1995 *Immunology Letters*, 44: 111-7.

La divulgación engloba anticuerpos que se han modificado introduciendo uno o más sitios de glucosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin modificar la funcionalidad del anticuerpo, p. ej., la actividad de unión a FcγRIIB. Los sitios de glucosilación pueden introducirse en la región variable y/o constante de los anticuerpos divulgados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "sitios de glucosilación" incluye cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo a la que se unirá específicamente y covalentemente un oligosacárido (es decir, hidratos de carbono que contienen dos o más monosacáridos unidos juntos). Las cadenas laterales de oligosacáridos están unidas normalmente al esqueleto de un anticuerpo mediante enlaces N- u O-. Glucosilación enlazada a N se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Glucosilación enlazada a O se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, p. ej., serina, treonina. Los anticuerpos pueden comprender uno o más sitios de glucosilación, incluyendo sitios de glucosilación enlazada a N y enlazada a O. Puede usarse cualquier sitio para glucosilación enlazada a N o enlazada a O conocido en la técnica de acuerdo con la presente invención. Un sitio de glucosilación enlazado a N ejemplar que es útil de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Dichos sitio o sitios pueden introducirse en un anticuerpo de la invención usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, "*In vitro* Mutagenesis" Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, y col. W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, pág. 106-116. Un procedimiento ejemplar para introducir un sitio de glucosilación en un anticuerpo puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de forma que se obtenga la secuencia Ser/Asn-X-Thr deseada.

En algunas realizaciones, la divulgación engloba procedimientos para modificar el contenido en hidratos de carbono de un anticuerpo divulgado en el presente documento mediante la adición o delección de un sitio de glucosilación. Los procedimientos para modificar el contenido en hidratos de carbono de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 6.218.149; el documento EP 0 359 096 B1; la publicación de EE. UU. N.º US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la publicación de EE. UU. N.º 2003/0115614; la patente de EE. UU. N.º 6.218.149; la patente de EE. UU. N.º 6.472.511. En otras realizaciones, la divulgación engloba procedimientos para modificar el contenido en hidratos de carbono de un anticuerpo divulgado en el presente documento eliminando uno o más restos de carbohidrato endógenos del anticuerpo.

La divulgación engloba además procedimientos para modificar una función efectora de un anticuerpo divulgado en el presente documento, en el que el procedimiento comprende modificar el contenido en hidratos de carbono del anticuerpo usando los procedimientos divulgados en el presente documento o conocidos en la técnica.

Pueden usarse las técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o uno de sus fragmentos, incluyendo, p. ej., mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con el anticuerpo original o su fragmento. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácido conservadoras que se realizan en uno o más residuos de aminoácido no esenciales predichos.

La divulgación también engloba anticuerpos o sus fragmentos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o de una cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera variables del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. La divulgación engloba además anticuerpos o sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o su fragmento une FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica, incluyendo búsquedas de proteínas BLAST.

La divulgación también engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen FcγRIIA, en el que dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo están codificados por una secuencia de nucleótidos que hibrida con la

secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, bajo condiciones rigurosas. En una realización preferida, la divulgación proporciona anticuerpos o sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una cadena pesada variable y/o ligera variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable y/o ligera variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, bajo condiciones rigurosas. En una realización preferida, la divulgación proporciona anticuerpos o sus fragmentos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o sus fragmentos unen FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, hibridación con ADN unido a filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC 0,2X/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas, tales como hibridación con ADN unido a filtro en SSC 6X a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC 0,1X/SDS al 0,2 % a aproximadamente 60 °C o cualesquiera otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por los expertos en la técnica (véanse, p. ej., Ausubel, F.M. y col., ed. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 as 6.3.6 y 2.10.3).

5.1.1 Conjugados de anticuerpos

La divulgación engloba anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) con polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado, o una parte de él, preferentemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no tiene que ser necesariamente directa, sino que puede producirse a través de secuencias enlazadoras. Pueden usarse anticuerpos, por ejemplo, para dirigir polipéptidos heterólogos hacia tipos celulares concretos, bien *in vitro* o *in vivo*, fusionando o conjugando los anticuerpos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular específicos. Los anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos también pueden usarse en procedimientos de purificación e inmunoensayos *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., la publicación PCT N.º WO 93/2 1232; el documento EP 439.095; Naramura y col., Immunol. Lett., 39:91-99, 1994; la patente de EE. UU. 5.474.981; Gillies y col., PNAS, 89:1428-1432, 1992; y Fell y col., J. Immunol., 146:2446-2452, 1991.

Además, puede conjugarse un anticuerpo con un agente terapéutico o un resto de fármaco que modifica una respuesta biológica determinada. Los agentes terapéuticos o restos de fármaco no deben interpretarse como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que poseen una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas (es decir, PE-40) o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antivírica de fitolaca americana, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones, incluyendo, pero sin limitarse a, interferón α (IFN-α), interferón β (IFN-β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador tisular del plasminógeno (TPA), un agente apoptótico (p. ej., TNF-α, TNF-β, AIM I divulgada en la publicación PCT N.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación PCT N.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi y col., J. Immunol., 6:1567-1574, 1994) y VEGF (en la publicación de PCT N.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (p. ej., angiostatina o endostatina) o un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (p. ej., interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF") o un factor de crecimiento (p. ej., hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

Los anticuerpos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexahistidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 86:821-824, 1989, por ejemplo, la hexahistidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell, 37:767 1984) y la marca "flag" (Knappik y col., Biotechniques, 17(4):754-761, 1994).

La divulgación incluye además composiciones que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento F(ab)₂ o una porción de ellos. Los procedimientos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpos son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las publicaciones internacionales N.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., 1991, PNAS 88: 10535-10539; Zheng y col., 1995, J. Immunol. 164:5590-5600; y Vil y col., 1992, PNAS

89:11337-11341.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de reordenamiento de genes, reordenamiento de motivos, reordenamiento de exones y/o reordenamiento de codones (a las que se hace referencia conjuntamente como "reordenamiento de ADN"). El reordenamiento de ADN puede emplearse para modificar las actividades de los anticuerpos divulgados en el presente documento o sus fragmentos (p. ej. anticuerpos o sus fragmentos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas). Véanse, en general, las patentes de EE. UU. N.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458 y Patten y col., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, y col., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Los anticuerpos o sus fragmentos, o los anticuerpos codificados o sus fragmentos, pueden modificarse sometiéndolos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros procedimientos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, porciones que se unen específicamente a FcγRIIB, pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La divulgación también engloba anticuerpos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para los que se desea incrementar su semivida sérica. Los anticuerpos pueden usarse diagnósticamente para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. Se puede facilitar la detección acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales que emiten positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable puede estar acoplada o conjugada directamente con el anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Tales diagnóstico y detección pueden llevarse a cabo acoplando el anticuerpo con sustancias detectables, incluyendo, pero sin limitarse a, diversas enzimas, enzimas, incluyendo pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aecuatorina; material radioactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{106}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn); metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos.

Un anticuerpo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (p. ej., un agente citostático o citocídico), un agente terapéutico o un elemento radioactivo (p. ej., emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamino platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (anteriormente, actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Además, un anticuerpo puede conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radioactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para los ejemplos de materiales radioactivos). En algunas realizaciones, el quelante macrocíclico es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Tales moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo y col., 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Peterson y col., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; y Zimmerman y col., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26:943-50.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas; véanse, p. ej., Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (ed.), 1985, pág. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (ed.), 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And*

Clinical Applications, Pinchera y col. (ed.), 1985, pág. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (ed.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; y Thorpe y col., *Immunol Rev.*, 62:119-58, 1982.

5 Un anticuerpo o uno de sus fragmentos, con o sin un resto terapéutico conjugado con él, administrado solo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) pueden usarse como un agente terapéutico.

Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la patente de EE. UU. N.º 4.676.980.

10 Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.2 Inmunización, rastreo e identificación de anticuerpos y caracterización de anticuerpos monoclonales

15 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de las tecnologías de hibridoma, recombinante y de presentación en fagos o una de sus combinaciones. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed 1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pág. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un sólo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procarionota o de fago, y no al procedimiento mediante el cuál se produce.

25 Los procedimientos para producir y rastrear anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son de rutina y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un antígeno de interés o una célula que expresa dicho antígeno. Una vez se detecta una respuesta inmunitaria, p. ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se retira el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después mediante técnicas bien conocidas con cualesquiera células de mieloma adecuadas. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitante. Después, los clones de hibridoma se ensayan mediante procedimientos conocidos en la técnica para células que segregan anticuerpos capaces de unir el antígeno. Puede generarse fluido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos.

30 En una realización concreta, la divulgación proporciona un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos monoclonales unen FcγRIIA, que comprende: inmunizar uno o más ratones transgénicos en FcγRIIA (véanse los documentos US 5.877.396 y US 5.824.487) con el dominio extracelular de FcγRIIB humano purificado, aminoácidos 1-180; producir líneas celulares de hibridoma a partir de células de bazo de dichos ratones, rastrear dichas líneas celulares de hibridoma para detectar una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos se unen FcγRIIA. En otra realización específica, la divulgación proporciona un procedimiento para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que unen específicamente FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos monoclonales unen FcγRIIA, comprendiendo además dicho procedimiento: inmunizar uno o más ratones transgénicos en FcγRIIA con FcγRIIB purificado o uno de sus fragmentos inmunogénicos, reforzar la inmunización de dichos ratones un número de veces suficiente para producir una respuesta inmunitaria, producir líneas celulares de hibridoma a partir de células de bazo de dichos uno o más ratones, rastrear dichas líneas celulares de hibridoma para localizar una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos unen FcγRIIA. En una realización, dichos ratones se inmunizan con FcγRIIB purificado que se ha mezclado con cualquier adyuvante conocido en la técnica para potenciar la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes que pueden usarse en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de proteína; adyuvantes bacterianos p. ej., bacterias completas (BCG, *Corynebacterium parvum*, *Salmonella mi nnesota*) y componentes bacterianos, incluyendo el esqueleto de la pared bacteriana, dimicolato de trehalosa, monofosforil lípido A, residuo extraíble con metanol (MER) del bacilo tuberculoso, adyuvante de Freund completo o incompleto, adyuvantes víricos; adyuvantes químicos, p. ej., hidróxido de aluminio, yodoacetato y hemisuccinato de colesterilo o adyuvantes de ADN desnudo. Otros adyuvantes que pueden usarse en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen toxina colérica, proteínas de paropoxvirus, MF-59 (Chiron Corporation; véase también Bieg y col., 1999, *Autoimmunity*, 31(1): 15-24), MPL® (Corixa Corporation; véase también Lodmell D.L y col., 2000 *Vaccine*, 18: 1059-1066; Ulrich y col., 2000, *Methods in Molecular Medicine*, 273-282; Johnson y col., 1999, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 4640-4649; Baldrige y col., 1999 *Methods*, 19: 103-107), adyuvante RC-529 (Corixa Corporation; el principal compuesto a partir de la colección química de aminoalquil glucosamínido 4-fosfato (AGP) de Corixa, véase también www.corixa.com) y adyuvante DETOX™ (Corixa Corporation; el adyuvante DETOX™ incluye adyuvante MPL® (monofosforil lípido A) y esqueleto de pared celular micobacteriana; véase también Eton y col., 1998, *Clin. Cancer Res*, 4(3):619-27; y Gubta R. y col., 1995, *Vaccine*, 13(14):1263-76.)

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa y la región variable, la región CH1 y la región bisagra de la cadena pesada.

Por ejemplo, también pueden generarse anticuerpos usando diversos procedimientos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En una realización concreta, dichos fagos pueden utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno, tales como Fab, Fv o Fv estabilizado por enlace disulfuro, expresados a partir de un repertorio o colección de anticuerpos combinatoria (p. ej., humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que une el antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, p. ej., usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una perla. Los fagos usados en estos procedimientos son normalmente fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan como una proteína fusionada por recombinación con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Los ejemplos de procedimientos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar las inmunoglobulinas, o sus fragmentos, divulgadas en el presente documento incluyen los divulgados en Brinkman y col., *J. Immunol. Methods*, 182:41-50, 1995; Ames y col., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186, 1995; Kettleborough y col., *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958, 1994; Persic y col., *Gene*, 187:9-18, 1997; Burton y col., *Advances in Immunology*, 57:191-280, 1994; en la solicitud PCT N.º PCT/GB91/01134; en las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; y en las patentes de EE. UU. N.º 5,698,426; 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, pueden aislarse las regiones codificantes de anticuerpo a partir del fago y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento deseado y expresarse en cualquier cualquier huésped deseada, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, p. ej., como se describe con detalle a continuación. Por ejemplo, pueden emplearse también técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; en Mullinax y col., *BioTechniques*, 12 (6):864-869, 1992; y en Sawai y col., *AJRI*, 34:26-34, 1995; y Better y col., *Science* 240:1041-1043, 1988. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir anticuerpos y Fv monocatenarios incluyen los descritos en las patentes de EE. UU. N.º 4.946.778 y 5.258.498; en Huston y col., *Methods in Enzymology*, 203:46-88, 1991; en Shu y col., *PNAS*, 90:7995-7999, 1993; en Skerra y col., *Science* 240:1038-1040, 1988.

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para incrementar la afinidad de un anticuerpo de la invención por FcγRIIB. Esta la técnica sería útil para la obtención de anticuerpos de alta afinidad que podrían usarse en los procedimientos combinatorios divulgados en el presente documento. La tecnología, denominada maduración de afinidad, emplea mutagénesis o desplazamiento por CDR y reelección usando FcγRIIB o uno de sus fragmentos antigénicos para identificar anticuerpos que se unen con una afinidad más alta al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial u original (véase, p. ej., Glaser y col., 1992, *J. Immunology* 149:3903). La mutagénesis de codones enteros en lugar de nucleótidos sueltos da como resultado un repertorio semi-aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Se pueden construir bibliotecas que consisten en un conjunto de clones variantes, cada uno de los cuales difiere en una sola modificación de aminoácido en una sola CDR y que contienen variantes que representan cada sustitución de aminoácido posible para cada residuo de CDR. Los mutantes con afinidad de unión por el antígeno incrementada pueden rastrearse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier procedimiento de rastreo conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con afección por el antígeno incrementada (p. ej., ELISA), (véanse Wu y col., 1998, *Proc Natl. Acad Sci. USA* 95:6037; Yelton y col., 1995, *J. Immunology* 155:1994). También es posible un desplazamiento por CDR que aleatoriza la cadena ligera (véase Schier y col., 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden caracterizarse adicionalmente por mapeo de epítomos, de modo que pueden seleccionarse los anticuerpos que tienen mayor especificidad por FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los procedimientos de mapeo de epítomos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se engloban dentro de los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones pueden usarse proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB para el mapeo del epítomo de un anticuerpo divulgado en el presente documento. En una realización específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de un FcγRIIB fusionada con la porción Fc parte de una IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender además sustituciones de aminoácidos y/o reemplazos de determinadas regiones del receptor con la región correspondiente de un receptor homólogo, p. ej., FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 2 a continuación. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión de IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo C terminal de FcγRIIB y el último con el extremo C terminal de FcγRIIA y pueden usarse para diferenciar la unión al extremo C. Los demás tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión de IgG y el extremo N terminal de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula receptora en la que se unen los anticuerpos.

Tabla 2. Lista de las proteínas de fusión que pueden usarse para estudiar el epítomo de los anticuerpos

monoclonales anti-FcγRIIB. Los residuos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión de IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita.

Plásmido	Receptor	N-ter	172-180	C-ter
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	APS-----SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	QKFSRLDPN	APS-----SS (IIb)
pMGX127		IIa	QKFSRLDPT	APS-----SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	APS-----SS (IIb)
pMGX129		IIa	QKFSHLDPT	APS-----SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	APS-----SS (IIb)
pMGX131		IIa	QKFSRLDPN	VPSMGSSS (IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	VPSMGSSS (IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	QKFSRLDPT	VPSMGSSS (IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	QKFSHLDPT	VPSMGSSS (IIa)
pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	VPSMGSSS (IIa)
pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	VPSMGSSS (IIa)

5 Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de la unión a un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención, p. ej., un ELISA. En otras realizaciones, puede realizarse una confirmación adicional de la especificidad del epítipo usando péptidos con residuos específicos reemplazados con los de la secuencia de FcγRIIA.

10 La divulgación engloba la caracterización de los anticuerpos producidos mediante los procedimientos divulgados en el presente documento usando determinados ensayos de caracterización para identificar la función de los anticuerpos, particularmente la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización divulgados en el presente documento pueden medir la fosforilación de residuos de tirosina del motivo ITIM de FcγRIIB o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por los receptores de linfocitos B. Los ensayos de caracterización divulgados en el presente documento pueden ser ensayos basados en células o sin células.

15 Ha sido bien establecido en la técnica que, en mastocitos, la coagregación de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, conduce a la inhibición de la desgranulación inducida por antígenos, la movilización de calcio y la producción de citocinas (Metcalf D.D. y col. 1997, *Physiol. Rev.* 77:1033; Long E.O. 1999 *Annu Rev. Immunol* 17: 875). Los detalles moleculares de esta ruta de señalización se han elucidado recientemente (Ott V. L., 2002, *J. Immunol.* 162 (9): 4430-9). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en la tirosina de su motivo ITIM y después recluta la inositol-5-fosfatasa que contiene un dominio de homología con Src 2 (SHIP), una inositol polifosfato-5-fosfatasa que contiene un dominio SH2, que está a su vez fosforilada y se asocia con Shc y p62^{dok} (p62^{dok} es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras que incluye dominios de señalización tales como un dominio aminoterminal de homología con pleckstrina (dominio PH), un dominio PTB y una región carboxi terminal que contienen motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino y col., 1997, *Cell*, 88: 197; Yamashi y col., 1997, *Cell*, 88:205).

20 La divulgación engloba caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento en la modulación de una o más respuestas mediadas por IgE. Preferentemente, se usarán líneas celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad para IgE y el receptor de baja afinidad para FcγRIIB para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB en la modulación de respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, se usarán células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. y col. 1981 *Eur. J Immunol.* 11:317) transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa en los procedimientos divulgados en el presente documento. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que se ha usado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización posteriores a la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio inducida por FcεRI, la desgranulación y la producción de citocinas (Malbec y col., 1998, *J. Immunol.* 160:1647; Daeron y col., 1995, *J. Clin. Invest.* 95:577; Ott y col., 2002, *J. of Immunol.* 168:4430-4439).

35 En algunas realizaciones, la divulgación engloba caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento para la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. y col. 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317) que se han

transfectado con FcγRIIB se sensibilizan con IgE y se estimulan con fragmentos F(ab')₂ de IgG anti-ratón de conejo, para agregar FcεRI solo o con coagregado de IgG anti-ratón de conejo completa para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de moléculas de señalización corriente abajo puede ensayarse tras la adición de anticuerpos divulgados en el presente documento a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, pueden ensayarse la fosforilación de las tirosinas de FcγRIIB y el reclutamiento y la fosforilación de SHIP, la activación de miembros de la familia de las MAP cinasas, incluyendo, pero sin limitarse a, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosinas de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI por los anticuerpos divulgados en el presente documento puede consistir en lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular células RBL-H23 con F(ab')₂ de IgG anti-ratón de conejo (para agregar FcεRI solo y producir la señalización mediada por FcεRI, como un control) o estimular células RBL-H23 con IgG anti-ratón de conejo completas (para coagregar FcγRIIB y FcεRI, dando como resultado la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que han sido estimuladas con anticuerpos de IgG anti-ratón de conejo completas pueden además preincubarse con los anticuerpos divulgados en el presente documento. Medir la actividad dependiente de FcεRI de células que se han preincubado con los anticuerpos divulgados en el presente documento y de las células que no se han preincubado con dichos anticuerpos y comparar los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células, indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por dichos anticuerpos.

El ensayo ejemplar descrito anteriormente pueden usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión de ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI evitando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Asimismo, este ensayo identifica anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y que agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI promoviendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

En una realización preferida, la actividad dependiente de FcεRI es al menos una o más de las siguientes: la modulación de moléculas de señalización corriente abajo (p. ej., la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, la modulación del reclutamiento de SHIP, la modulación de la actividad MAP cinasa, la modulación del estado de fosforilación de SHIP, la modulación de la asociación de SHIP y Shc, la modulación del estado de fosforilación de p62^{dok}, la modulación de la asociación de p62^{dok} y SHIP, la modulación de la asociación de p62^{dok} y RasGAP, la modulación de la movilización de calcio, la modulación de la desgranulación y la modulación de la producción de citocinas. En otra realización preferida más, la actividad dependiente de FcεRI es la liberación de serotonina y/o la entrada de Ca⁺⁺ extracelular y/o la activación de mastocitos dependiente de IgE. Es sabido por un experto en la técnica que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, estimula el reclutamiento de SHIP, estimula la fosforilación de tirosinas de SHIP y la asociación con Shc e inhibe la activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas, incluyendo, pero sin limitarse a, Erk1, Erk2, JNK, p38. También es sabido por los expertos en la técnica que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación potenciada de tirosinas de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE monitorizando y/o midiendo la desgranulación de mastocitos o basófilos, preferentemente en un ensayo basado en células. Preferentemente, los mastocitos o basófilos para su uso en tales ensayos han sido manipulados para que contengan FcγRIIB humano usando procedimientos estándar de recombinación conocidos por el experto en la técnica. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos) basado en células. La liberación de β-hexosaminidasa por mastocitos y basófilos es un acontecimiento principal en afecciones alérgicas e inflamatorias (Aketani y col., 2001 Immunol. Lett. 75: 185-9; Aketani y col., 2000 Anal. Chem. 72: 2653-8). La liberación de otros mediadores inflamatorios, incluyendo, pero sin limitarse a, serotonina e histamina, pueden ensayarse para medir una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. Aunque sin pretender quedar ligados a ningún mecanismo de acción concreto, la liberación de gránulos tales como los que contienen β-hexosaminidasa desde mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia mediante el entrecruzamiento de FcεRI con antígenos multivalentes.

Un ensayo ejemplar para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento en la mediación de una respuesta mediada por IgE es un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa que comprende lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células con IgE de ratón sola o IgE de ratón y un anticuerpo anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento; estimular las células con diversas concentraciones de F(ab)₂ anti-ratón de cabra, preferentemente en un intervalo de 0,03 μg/ml a 30 μg/ml durante aproximadamente 1 hora; recoger el sobrenadante; lisar las células; y medir la actividad β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante mediante un ensayo colorimétrico, p. ej., usando p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosamínido. La actividad β-hexosaminidasa liberada se expresa como porcentaje de la actividad liberada con relación a la actividad total. La actividad β-hexosaminidasa liberada se medirá y se comparará en células tratadas con antígeno solo; IgE sola; IgE y un anticuerpo anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, una vez que las células son sensibilizadas con IgE de ratón sola y expuestas a fragmentos F(ab)₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal, se produce la agregación y el entrecruzamiento de FcεRI,

ya que el anticuerpo policlonal reconoce la cadena ligera de la IgE murina unida al FcεRI; que, a su vez, conduce a la activación y desgranulación de mastocitos. Por otra parte, cuando las células son sensibilizadas con IgE de ratón y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención y expuestas a fragmentos F(ab)₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal, se produce el entrecruzamiento de FcγRIIB y FcεRI, dando como resultado la inhibición de la desgranulación inducida por FcεRI. En cualquier caso, el F(ab)₂ anti-ratón de cabra induce una liberación de β-hexosaminidasa dependiente de dosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB unidos al receptor FcγRIIB y entrecruzados con FcεRI no afectan a la activación de la ruta inhibidora, es decir, no existe ninguna modificación en el nivel de desgranulación en presencia de un anticuerpo anti-FcγRIIB. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB median una activación más intensa del receptor inhibitor, FcγRII, cuando está unido con el anticuerpo anti-FcγRIIB, permitiendo un entrecruzamiento eficaz con FcεRI y la activación de ruta inhibidora de FcγRIIB homoaagregados.

La divulgación también engloba la caracterización del efecto de los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento en la respuesta celular mediada por IgE usando ensayos de movilización de calcio usando metodologías conocidas por un experto en la técnica. Un ensayo ejemplar de movilización de calcio puede comprender lo siguiente: cebar basófilos o mastocitos con IgE; incubar las células con un indicador de calcio, p. ej., Fura 2; estimular las células como se describe anteriormente; y monitorizar y/o cuantificar la concentración de calcio intracelular, por ejemplo, usando citometría de flujo. La divulgación engloba la monitorización y/o la cuantificación de la concentración de calcio intracelular mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento inhiben la activación celular mediada por IgE. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento bloquean las rutas inhibitoras reguladas por FcγRIIB o bloquean el sitio de unión de ligando en FcγRIIB y, de este modo, potencian la respuesta inmunitaria.

La capacidad para estudiar mastocitos humanos ha estado limitada por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos a largo plazo adecuados. Recientemente, se establecieron dos líneas celulares novedosas de mastocitos humanos dependientes de factor de células madre, denominadas LAD 1 y LAD 2, a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum y col., Leukemia research, pendiente de publicar). Se han descrito ambas líneas celulares como que expresan FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. La invención engloba el uso de células de LAD 1 y 2 en los procedimientos de la invención para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención sobre respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, pueden usarse ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células tales como los divulgados anteriormente en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento. En un ensayo ejemplar, se ceban mastocitos, p. ej., LAD 1, con IgE humanas quiméricas anti-nitrofenol (NP) y se exponen a BSA-NP, el antígeno polivalente, y se monitoriza la desgranulación de las células midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum y col., 2002, Leukemia research, pendiente de publicar).

En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una expresión baja de FcγRIIB endógeno, determinada usando procedimientos estándar conocidos en la técnica, p. ej., tinción de FACS, puede ser difícil monitorizar y/o detectar diferencias en la activación de la ruta inhibitora mediada por los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento. Por tanto, la divulgación engloba procedimientos alternativos, mediante los que puede regularse por incremento la expresión de FcγRIIB usando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que FcγRIIB está muy regulado por incremento en líneas celulares de monocitos, p. ej., THP1 y U937 (Tridandapani y col., 2002, J. Biol. Chem., 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop y col., 2001, J. of Immunol., 166: 531-537) por IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con AMP cíclico dibutirilo incrementa la expresión de FcγRII (Cameron y col., 2002 Immunology Letters 83, 171-179). Por tanto, la expresión endógena de FcγRIIB en mastocitos humanos para su uso en los procedimientos de la invención puede regularse por incremento usando citocinas, p. ej., IL-4, IL-13, con el fin de potenciar la sensibilidad de detección.

La invención también engloba caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento para la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas corriente abajo, tales como la activación y proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la progresión del ciclo celular y de la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende al menos uno o más de los siguientes: la modulación de moléculas de señalización corriente abajo (p. ej., el estado de fosforilación de FcγRIIB, el reclutamiento de SHIP, la localización de Btk y/o PLCγ, la actividad MAP cinasa, el reclutamiento de Akt (señal antiapoptótica), la movilización de calcio, la progresión del ciclo celular y la proliferación celular.

Aunque numerosas funciones efectoras de inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, se ha demostrado recientemente que los linfocitos B activados por lipopolisacárido (LPS) de ratones deficientes en SHIP muestran una inhibición mediada por FcγRIIB significativa de la movilización de calcio, la producción de Ins(1,4,5)P₃ y la fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler A. y col., 2001, Journal of Immunology, 167(1):

204-211). En consecuencia, pueden usarse linfocitos B *ex vivo* de ratones deficientes en SHIP para caracterizar los anticuerpos divulgados en el presente documento. Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos puede comprender lo siguiente: aislar linfocitos B esplénicos a partir de ratones deficientes en SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido y estimular dichas células con anti-IgM F(ab')₂ para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que se han estimulado con anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB pueden además preincubarse con los anticuerpos de la invención. La actividad dependiente de FcγRIIB de las células puede medirse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica. Comparar el nivel de actividad dependiente de FcγRIIB en células que se han preincubado con los anticuerpos divulgados en el presente documento y en células que no se han preincubado y la comparación de los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por dichos anticuerpos.

Medir la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, medir la movilización de calcio intracelular por citometría de flujo, medir la fosforilación de Akt y/o Erk, medir la acumulación de PI(3,4,5)P₃ mediada por BCR o medir la proliferación de linfocitos B mediada por FcγRIIB.

Los ensayos pueden usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que modulan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR bloqueando el sitio de unión de ligando (IgG) a FcγRIIB y antagonizando la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR evitando la coagregación de FcγRIIB y BCR. Los ensayos también pueden usarse para identificar anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y BCR y que agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR.

La divulgación se refiere a la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento para la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor que porta el motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) actúa para regular por disminución la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como su efector (Tridandapani y col. 2002, J. Biol. Chem. 277(7):5082-9). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB da como resultado la rápida fosforilación del residuo de tirosina del motivo ITIM de FcγRIIB, conduciendo a una potenciación de la fosforilación de SHIP, de la asociación de SHIP con Shc y de la fosforilación de proteínas con peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB da como resultado la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

La divulgación engloba además la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento por su inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, pueden estimularse células de una línea celular monocítica humana, THP-1, con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 frente a FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcγRIIA solo), o con el anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, puede ensayarse la modulación de moléculas de señalización corriente abajo, tales como la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, la fosforilación de Akt, y la fosforilación de proteínas con peso molecular de 120 y 60-65 kDa después de la adición de anticuerpos divulgados en el presente documento a las células estimuladas. Además, la eficacia fagocítica mediada por FcγRIIB de la línea celular de monocitos puede medirse directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención.

Otro ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos divulgados en el presente documento puede comprender lo siguiente: estimular células THP-1 con Fab del anticuerpo de ratón IV. 3 anti-FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcγRIIA solo y producir una señalización mediada por FcγRIIA); o con anticuerpo de ratón anti-FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA). Las células que se han estimulado con anticuerpo de ratón anti-FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra pueden además preincubarse con los anticuerpos divulgados en el presente documento. Medir la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que se han preincubado con dichos anticuerpos y de células que no se han preincubado con dichos anticuerpos y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos.

El ensayo ejemplar descrito puede usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión de ligando del receptor FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Asimismo, este ensayo identifica anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

En otra realización, la divulgación se refiere a la caracterización de la función de los anticuerpos divulgados en el presente documento midiendo la capacidad de células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceinados mediante procedimientos descritos anteriormente (Tridandapani y col., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ejemplar para medir la fagocitosis consiste en: tratar células THP-1 con los anticuerpos divulgados en el presente documento o con un anticuerpo de control que no se une a FcγRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en el que una diferencia en las actividades de las células (p. ej. la actividad de formación de rosetas, (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubiertas con IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1) y la velocidad fagocítica) indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos. Este ensayo puede usarse para identificar, por

ejemplo, anticuerpos que bloquean la unión a ligando del receptor FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que potencian la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

5 En una realización preferida, los anticuerpos divulgados en el presente documento modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos de al menos una o más de las siguientes formas: la modulación de moléculas de señalización corriente abajo (p. ej., la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, la modulación de la fosforilación de SHIP, la modulación de la asociación de SHIP y Shc, la modulación de la fosforilación de Akt, la modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de aproximadamente 120 60-65 kDa) y la modulación de la fagocitosis.

10 La divulgación engloba la caracterización de los anticuerpos divulgados en el presente documento usando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar el efecto de los anticuerpos sobre la función de células efectoras de los anticuerpos terapéuticos, p. ej., su capacidad para potenciar la actividad ADCC específica de tumores de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos antitumorales, anticuerpos antivíricos, anticuerpos antimicrobianos (p. ej., parásitos bacterianos y unicelulares), cuyos ejemplos se divulgan en el presente documento (sección 5.4.6). En particular, la divulgación engloba la caracterización de los anticuerpos divulgados en el presente documento por su efecto sobre la función de células efectoras mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos, p. ej., anticuerpos monoclonales específicos de tumores. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ensayarse de acuerdo con la divulgación, incluyen, pero no se limitan a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Puede usarse cualquier ensayo basado en células o sin células conocido por los expertos en la técnica para determinar la actividad funcional de células efectoras (para ensayos de células efectoras, véanse Penissia y col., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121:179-92; Baggiolini y col., 1998 *Experientia*, 44(10): 841-8; Lehmann y col., 2000 *J. Immuno/. Methods*, 243(1-2): 229-42; Brown EJ. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-64; Munn y col., 1990 *J. Exp. Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid y col., 2002 *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding y col., 1998, *Immunity* 8:403-411).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ensayarse para determinar su efecto sobre la actividad ADCC mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos en células efectoras, p. ej., linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Perussia y col., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92). "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" como se usan en el presente documento poseen su significado normal y habitual en la técnica y se refieren a una reacción *in vitro* mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR (p. ej., células monocíticas tales como linfocitos citolíticos naturales (NK) y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. En principio, puede activarse cualquier célula efectora con un FcγR activador para mediar la ADCC. Las principales células para mediar la ADCC son linfocitos NK que expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos, dependiendo de su estado de activación, localización o diferenciación, pueden expresar FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para una revisión de la expresión de FcγR en células hematopoyéticas, véase p. ej., Ravetch y col., 1991, *Annu Rev. Immunol.*, 9:457-92.

Las células efectoras son leucocitos que expresan uno o más FcγR y realizar funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Las células efectoras que pueden usarse en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferidos los PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una de sus fuentes nativas, p. ej., a partir de sangre o PMBC como se describe en el presente documento. Preferentemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC divulgados en el presente documento son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que, preferentemente, se purifican a partir de sangre humana normal, usando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, p. ej., usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Por ejemplo, las PBMC pueden aislarse separando en capas sangre completa sobre Ficoll-Hypaque y centrifugando las células a 500 g, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa de leucocitos puede recogerse como células efectoras. Otras células efectoras que pueden usarse en los ensayos de ADCC divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, macrófagos derivados de monocitos (MDM). Los MDM que se usan como células efectoras en los procedimientos de la invención se obtienen, preferentemente, como o se usan recién preparados, (p. ej., de Advanced Biotechnologies, MD). En las realizaciones más preferidas, se usan monocitos humanos elutriados como células efectoras en los procedimientos divulgados en el presente documento. Los monocitos humanos elutriados expresan receptores activadores, FcγRIIIA y FcγRIIA y el receptor inhibidor FcγRIIB. Los monocitos humanos están comercialmente disponibles y pueden obtenerse como reservas congeladas, descongeladas en medio basal que contiene un suero AB humano al 10 % o en medio basal con suero humano y 25-50 ng/ml de GM-CSF. Los niveles de expresión de FcγR en las células pueden determinarse directamente; p. ej., usando análisis por FACS. Alternativamente, se deja que las células maduren a macrófagos y después se tiñen, ya que el nivel de expresión de FcγRIIB se incrementa en macrófagos. Los anticuerpos que pueden usarse para determinar el nivel de expresión de FcγR incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-FcγRIIA humano, p. ej., IV.3-FITC; anticuerpos anti-FcγRI, p. ej., 32.2 FITC; y anticuerpos anti-FcγRIIIA, p. ej., CD16-PE, 3G8. Lo más preferentemente, los MDM se estimulan con IFNγ y además se tratan con citocinas, p. ej., 200 unidades/ml de GM-

CSF y/o M-CSF que se sabe que potencian la viabilidad de los monocitos en cultivo. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, el IFN γ regula por incremento la expresión de Fc γ R, en particular Fc γ RI y Fc γ RIIA. La expresión de diversos Fc γ R en las células efectoras para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento puede determinarse mediante análisis de FACS usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

Las células diana utilizadas en los ensayos ADCC revelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, p. ej., SK-BR-3 con número de acceso de ATCC HTB-30 (véase, p. ej., Tremp y col., 1976, Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, p. ej., células de Raji con número de acceso de ATCC CCL-86 (véase, p. ej., Epstein y col., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), células de Daudi con número de acceso de ATCC CCL-213 (véase, p. ej., Klein y col., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10); líneas celulares de carcinoma ovárico, p. ej., OVCAR-3 (véase, p. ej., Hamilton, Young y col., 1983), SK-OV-3, PA-1, CAO3, OV-90 e IGROV-1 (disponibles del depósito del NCI Benard y col., 1985, Cancer Research, 45:4970-9). Las células diana deben ser reconocidas por el sitio de unión a antígeno del anticuerpo que se va a ensayar. Las células diana para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento pueden tener un nivel de expresión bajo, medio o alto de un antígeno canceroso. Los niveles de expresión del antígeno canceroso pueden determinarse usando procedimientos comunes conocidos por el experto en la técnica, p. ej., análisis de FACS. Por ejemplo, la divulgación engloba el uso de células de cáncer de ovario, en las que se expresa Her2/neu a diferentes niveles, tales como IGROV-1 (caracterizadas por una baja expresión de Her2/neu) u OVCAR-3 (caracterizadas por una expresión alta de Her2/neu). Otras líneas de células de carcinoma ovárico que pueden usarse como las células diana en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen OVCAR-8 (Hamilton y col., 1983, Cancer Res. 43:5379-89); SK-OV-3, OVCAR-4. Otras líneas celulares de cáncer de mama que puedan usarse en los procedimientos divulgados en el presente documento incluyen BT-549, MCF7 y HS578T, todas ellas disponibles del depósito del NCI.

Un ensayo ejemplar para determinar el efecto de los anticuerpos divulgados en el presente documento sobre la actividad ADCC de anticuerpos terapéuticos se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que consiste en: marcar células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula permeable a la membrana celular se usa comúnmente para el marcaje ya que une proteínas citoplásmicas y, aunque se libera de forma espontánea desde las células con cinética lenta, se libera de forma masiva tras la necrosis de la célula diana); preferentemente, las células diana expresan uno o más antígenos tumorales, opsonizando las células diana con uno o más anticuerpos que unen inmuno-específicamente los antígenos tumorales expresados en la superficie celular de las células diana, en presencia y ausencia de un anticuerpo divulgado en el presente documento, p. ej., 2B6, 3H7; combinar las células diana radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microvaloración a una proporción de células diana y células efectoras apropiada; incubar la mezcla de células, preferentemente durante 16-18 horas, preferentemente a 37 °C; recoger los sobrenadantes; y analizar la radioactividad de las muestras de sobrenadantes. La citotoxicidad de los anticuerpos terapéuticos en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención puede determinarse después, por ejemplo, usando la fórmula siguiente: % de lisis = (cpm experimentales - cpm de la fuga de la diana)/(cpm de la lisis de detergente - cpm de la fuga de la diana) x 100 %. Alternativamente, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la invención - % de lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Puede generarse un gráfico variando la proporción de células diana:efectoras o la concentración de anticuerpo.

En otra realización más, los anticuerpos divulgados en el presente documento se caracterizan por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, véase, p. ej., Ding y col., Immunity. 1998, 8:403-11.

En algunas realizaciones, la divulgación engloba caracterizar la función de los anticuerpos divulgados en el presente documento para potenciar la actividad ADCC de anticuerpos terapéuticos en un ensayo basado *in vitro* y/o en un modelo animal.

En una realización específica, la divulgación engloba determinar la función de los anticuerpos divulgados en el presente documento para potenciar la ADCC específica de tumores usando un modelo de cáncer de ovario y/o un modelo de cáncer de mama.

Preferentemente, los ensayos de ADCC divulgados en el presente documento se realizan usando más de una línea celular cancerosa, caracterizadas por la expresión de al menos un antígeno canceroso, en las que el nivel de expresión del antígeno canceroso varía entre las líneas celulares cancerosas usadas. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, realizar ensayos de ADCC en más de una línea celular en las que el nivel de expresión del antígeno canceroso varía, permitirá la determinación de la rigurosidad de la eliminación del tumor de los anticuerpos de la invención. En una realización, los ensayos de ADCC se realizan usando dos líneas celulares cancerosas que comprenden una primera línea celular cancerosa y una segunda línea celular cancerosa, en el que la primera línea celular se caracteriza por un alto nivel de expresión de un antígeno canceroso y la segunda línea celular cancerosa se caracteriza por un bajo nivel de expresión del antígeno canceroso.

En un ensayo ejemplar, OVCAR3, una línea celular de carcinoma ovárico, puede servir como diana tumoral que expresa los antígenos tumorales, Her2/neu y TAG-72; pueden usarse como efectores monocitos humanos, que expresan el Fc γ RIIA activador y el Fc γ RIIB inhibidor; y pueden usarse como anticuerpos específicos de tumor

anticuerpos murinos específicos, 4D5 y CC49. Las células OVCAR-3 están disponibles de ATCC y pueden derivarse de la ascitis maligna de una paciente con adenocarcinoma papilar progresivo de ovario después de quimioterapia combinada. Hamilton, Young, y col., 1983. Preferentemente, las células OVCAR-3 se propagan en medio suplementado con 0,01 mg/ml de insulina bovina. Pueden inyectarse 2×10^6 células OVCAR-3 viables por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos lampiños y NOD-SCID de edad y peso concordantes con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede calcularse mediante la fórmula: longitud-(anchura)²/2 y, preferentemente, no excede de 3 gramos. Un tumor dependiente de anclaje puede aislarse tras 6-8 semanas y pueden disociarse las células añadiendo 1 µg de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor tras incubarlo durante la noche. Después, pueden inyectarse las células i.p. para establecer el modelo de xenoinjerto y ensayarse como dianas en ensayos de ADCC como se describe en el presente documento para ensayar la ADCC potenciada de anticuerpos específicos de tumor, p. ej., CC49 y 4D5, por anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención.

Los hibridomas que segregan anticuerpos CC49 y 4D5 están disponibles de ATCC y las secuencias de nucleótidos de cadena pesada y de cadena ligera son de dominio público. Ricon, Gourlie, y col., 1993; Carter, Preser y col., 1992. Preferentemente, los anticuerpos 4D5 y CC49 se quimerizan usando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica de forma que la secuencia de Fc humana, p. ej., la región constante humana de IgG1, se inserta en la región variable de los anticuerpos murinos con el fin de proporcionar la función efectora. Los anticuerpos quiméricos 4D5 y CC49 se unen a través de su región variable a las líneas celulares diana y por medio de su región Fc a FcγR expresado en células efectoras humanas. CC49 está dirigido a TAG-72, una mucina de peso molecular alto que se expresa altamente en muchas células de adenocarcinoma y carcinoma ovárico. Lastroria y col., 1998; Szpak y col., 1989; Sheer y col., 1988. 4D5 está dirigido a Her2/neu, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Carter y col., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-9). Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden utilizarse después para estudiar la potenciación de la actividad ADCC de los anticuerpos específicos de tumor, bloqueando el FcγRIIB inhibitor. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, después de la activación de células efectoras que expresan al menos un FcγR activador, p. ej., FcγRIIA, la expresión del receptor inhibitor (FcγRIIB) se potencia y esto limita la eliminación de tumores, ya que la actividad ADCC de FcγRIIA se suprime. Sin embargo, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden servir como anticuerpo de bloqueo, es decir, un anticuerpo que evitará que la señal inhibitor se active y, por tanto, la señal de activación, p. ej. actividad ADCC, se mantendrá durante un periodo de tiempo mayor y puede dar como resultado una eliminación más potente del tumor.

Preferentemente, los anticuerpos divulgados en el presente documento para su uso en ensayos de ADCC han sido modificados para que comprendan al menos una modificación de aminoácido, de modo que su función efectora se ha reducido, lo más preferentemente anulado. En algunas realizaciones, los anticuerpos han sido modificados para que comprendan al menos una modificación de aminoácido que reduce la unión a un FcγR activador, p. ej., FcγRIIA, FcγRIIB, mientras que mantienen la actividad de bloqueo de FcγRIIB máxima en comparación con un anticuerpo de tipo natural divulgado en el presente documento. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden modificarse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica o divulgado en el presente documento. Puede usarse cualquier modificación de aminoácidos que se sabe que altera la función efectora de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento se modifican de forma que se modifica la posición 265, p. ej., la posición 265 está sustituida con alanina. En realizaciones preferidas, la región constante murina de un anticuerpo de la invención se cambia por la región constante humana correspondiente, que comprende una sustitución del aminoácido de la posición 265 con alanina, de modo que se suprime la función efectora, mientras que la actividad de bloqueo de FcγRIIB se mantiene. Se ha demostrado que un sólo cambio de aminoácido en la posición 265 de la cadena pesada de IgG1 reduce significativamente la unión a FcγR basándose en ensayos ELISA y ha dado como resultado la reducción de la masa tumoral. Shields y col., 2002 y Clynes y col., (2000). En otras realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento se modifican de manera que se modifica la posición 297, p. ej., la posición 297 se sustituye con glutamina, de modo que se elimina el sitio de glucosilación enlazado a N. Véase, Shields y col., 2001; Sondermann y col., 2000; Jefferis y col., 1995. Se ha informado de que la modificación en este sitio suprime toda interacción con FcγR. En realizaciones preferidas, la región constante murina de un anticuerpo divulgado en el presente documento se cambia por la región constante humana correspondiente, que comprende una sustitución del aminoácido de la posición 265 y/o 297, de modo que se suprime la función efectora, mientras que la actividad de bloqueo de FcγRIIB se mantiene.

Un ensayo ejemplar para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos específicos de tumor en presencia y en ausencia de los anticuerpos divulgados en el presente documento es un ensayo de fluorescencia a base de europio no radioactivo (BATDA, Perkin Elmer) y puede consistir en lo siguiente: marcar las células diana con un acetoximetil éster o un éster potenciador de la fluorescencia que forma un ligando hidrófilo (TDA) con la membrana de células mediante la hidrólisis de los ésteres; este complejo es incapaz de salir de la célula y se libera sólo tras la lisis de la célula por los efectores; añadir las dianas marcadas a las células efectoras en presencia de anticuerpos anti-tumorales y un anticuerpo divulgado en el presente documento; incubar la mezcla de las células efectoras y las dianas durante de 6 a 16 horas, preferentemente a 37 °C. El grado de actividad ADCC puede ensayarse midiendo la cantidad de ligando que se libera e interacciona con europio (reactivo DELFIA; PerkinElmer). El ligando y el europio forman un quelato muy estable y altamente fluorescente (EuTDA) y la fluorescencia medida es directamente proporcional al número de células lisadas. El porcentaje de lisis específica puede calcularse usando la fórmula: (lisis experimental-lisis espontánea/lisis total-lisis espontánea) x 100 %. La actividad NK quedará excluida con un un F(ab)2 de un anticuerpo

de conejo anti-asialo G_{M1} (WAKO Pure chemical, Richmond, VA) en el ensayo de ADCC. Este ensayo *in vitro* puede usarse como referencia para establecer las condiciones para el modelo de eliminación de tumores *in vivo* como se divulga en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, si la sensibilidad del ensayo de ADCC basado en fluorescencia es demasiado baja para detectar la actividad ADCC de los anticuerpos terapéuticos, la divulgación engloba ensayos de ADCC basados en radioactividad, tales como un ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Los ensayos basados en radioactividad pueden realizarse en lugar de o en combinación con ensayos de ADCC basados en fluorescencia.

10 Un ensayo ejemplar de liberación de ⁵¹Cr para caracterizar los anticuerpos divulgados en el presente documento puede comprender lo siguiente: marcar 1-2 x 10⁶ células OVCAR-3 con 50 µCi de ⁵¹Cr durante 12 h; tripsinizar las células; añadir 5 x 10³ células a una placa de 96 pocillos; opsonizar las células diana con anticuerpos 4D5 y CC49 en presencia y ausencia de un anticuerpo divulgado en el presente documento a una concentración específica de, preferentemente 4D5 y CC49 están a una concentración que varía desde 1-15 µg/ml; añadir las células diana opsonizadas a macrófagos derivados de monocitos (MDM) (células efectoras); preferentemente en una proporción que varía desde 10:1 a 100:1; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; recoger los sobrenadantes; y analizar la radioactividad en el sobrenadante. La citotoxicidad de 4D5 y CC49 en presencia y ausencia de un anticuerpo divulgado en el presente documento puede determinarse después, por ejemplo, usando la fórmula siguiente: % de lisis = (cpm experimentales - cpm de la fuga de la diana)/(cpm de la lisis de detergente - cpm de la fuga de la diana) x 100 %. Alternativamente, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la invención - % de lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Puede generarse un gráfico variando la proporción de células diana:efectoras o la concentración de anticuerpo.

15 En algunas realizaciones, cuando los ensayos de ADCC basados en fluorescencia y/o los ensayos de ADCC basados en radioactividad no son lo suficientemente sensibles para la detección de la actividad ADCC de los anticuerpos terapéuticos en presencia de un anticuerpo divulgado en el presente documento, la divulgación engloba el ensayo de citotoxicidad mediado por monocitos como se describe anteriormente. Kleinerman, Gano, y col., 1995. Se ha demostrado que el IFN-γ ceba monocitos para que se conviertan en tumorocidas *in vitro*. Adams y Marino 1981. En algunas realizaciones, se usará una modificación del ensayo de citotoxicidad mediado por monocitos usando células OVCAR-3 y monocitos activados si ninguno de los ensayos, el ensayo basado en europio y el de liberación de ⁵¹Cr, da como resultado la detección de la actividad ADCC. Un ensayo ejemplar de citotoxicidad mediado por monocitos puede comprender lo siguiente: incubar células tumorales en la fase de crecimiento exponencial durante la noche con 0,5 µCi ³[H] timidina; lavar las células para retirar el marcaje no unido; tripsinizar las células; añadir las células diana marcadas a monocitos adherentes marcados activados con IFNγ (células efectoras) a una proporción efector:diana que varía desde 100:1 hasta 10:1 durante 24 horas, preferentemente a 37 °C; retirar las células no adherentes; realimentar las células con medio fresco; y cultivar las células durante otros dos días. Preferentemente, el ensayo se realiza en ausencia de anticuerpo, en presencia de 1-15 µg/ml de anticuerpo antitumoral y con monocitos activados, bien preincubados con un anticuerpo anti-FcγRIIB (1-15 µg/ml) o coincubados con un anticuerpo anti-FcγRIIB y células tumorales. Preferentemente, el ensayo se realiza en paralelo usando monocitos no tratados. La radioactividad de los lisados puede determinarse mediante la fórmula:

20 [radioactividad (cpm) de las células diana cultivadas con monocitos y anticuerpos - radioactividad de las células diana cultivadas con monocitos en presencia de IFNγ y anticuerpos] / radioactividad las células diana cultivadas con monocitos y anticuerpos x 100.

25 En algunas realizaciones, la actividad *in vivo* de los anticuerpos frente a FcγRIIB divulgados en el presente documento se determina en modelos de tumores humanos de xenoinjerto. Los tumores pueden establecerse usando cualquiera de las líneas celulares cancerosas descritas anteriormente. En algunas realizaciones, los tumores se establecerán con dos líneas celulares cancerosas, en las que la primera línea celular cancerosa se caracteriza por una baja expresión de un antígeno canceroso y una segunda línea celular cancerosa, en la que la segunda línea celular cancerosa se caracteriza por una alta expresión del mismo antígeno canceroso. La eliminación del tumor puede determinarse después usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica, usando un anticuerpo antitumoral que une inmunoespecíficamente el antígeno canceroso de la primera y la segunda línea celular cancerosa y un modelo de ratón adecuado, p. ej., modelo de ratón atímico Balb/c (p. ej., Jackson Laboratories, Taconic), con monocitos humanos transferidos adoptivamente y MDM como células efectoras. Después, puede ensayarse cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente en este modelo animal para evaluar el papel del anticuerpo anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento en la eliminación de tumores.

30 Un procedimiento ejemplar para ensayar la actividad *in vivo* de un anticuerpo divulgado en el presente documento pueden comprender lo siguiente: establecer un modelo murino de xenoinjerto usando una línea celular cancerosa caracterizada por la expresión de un antígeno canceroso y determinar el efecto de un anticuerpo divulgado en el presente documento en un anticuerpo específico para el antígeno canceroso expresado en la línea celular cancerosa en la mediación de la eliminación del tumor. Preferentemente, la actividad *in vivo* se ensaya en paralelo usando dos líneas celulares cancerosas, en las que la primera línea celular cancerosa se caracteriza por un primer antígeno canceroso expresado a niveles bajos y una segunda línea celular cancerosa, caracterizada por el mismo antígeno canceroso expresado a un nivel más alto en relación con la primera línea celular cancerosa. Estos experimentos

incrementarán, por tanto, la rigurosidad de la evaluación del papel de un anticuerpo divulgado en el presente documento en la eliminación del tumor. Por ejemplo, pueden establecerse los tumores con la línea celular IGROV-1 y puede evaluarse el efecto de un anticuerpo anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento en la eliminación del tumor de un anticuerpo específico frente a Her2/neu. Los ratones pueden colocarse en grupos de 4 y monitorizarlos tres veces por semana. Con el fin de establecer los modelos tumorales de xenoinjerto, pueden inyectarse 5x10⁶ células viables, p. ej., IGROV-1, SKBR3, p. ej., s.c. en ratones, p. ej., tres ratones atímicos lampiños hembra de edad y peso concordantes usando, por ejemplo, Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede determinarse mediante la fórmula: longitud x (anchura)²/2; y, preferentemente, no excede de 3 gramos. Para someter a las células a expansión *in vivo*, puede aislarse un tumor dependiente de anclaje y pueden disociarse las células añadiendo, por ejemplo, colagenasa, preferentemente 1 μg por gramo de tumor a 37 °C. Se prefiere la inyección de células IGROV-1 por la vía s.c. La inyección de células IGROV-1 s.c. da lugar a tumores de crecimiento rápido, mientras que la vía i.p. induce una carcinomatosis peritoneal que mata a los ratones en 2 meses (Benard y col., 1985, Cancer Res. 45:4970-9). Dado que que las células IGROV-1 forman tumores en un plazo de 5 semanas, en el día 1 después de la inyección de células tumorales, se coinyectan i.p. monocitos como células efectoras junto con un anticuerpo específico frente a Her2/neu, p. ej. Ch4D5, y un anticuerpo divulgado en el presente documento, p. ej., 2B6 o 3H7 quiméricos como se describe anteriormente. Preferentemente, los anticuerpos se inyectan a 4 μg cada uno por gramo de peso corporal del ratón (mbw). La inyección inicial irá seguida de inyecciones semanales de anticuerpos durante las 4-6 semanas posteriores. Las células efectoras humanas se repondrán una vez cada 2 semanas. Un grupo de ratones no recibirá anticuerpo terapéutico pero se inyectará con 4D5 quimérico que comprende una mutación N297A e IgG1 humanas como anticuerpos de control de isotipo para los anticuerpos antitumorales y anti-FcγRIIB, respectivamente.

La Tabla 3 que aparece a continuación es una configuración ejemplar para estudios de eliminación de tumores de acuerdo con la divulgación. Como se muestra en la Tabla 3, serán necesarios seis grupos de 48 ratones cada uno para ensayar el papel de un anticuerpo divulgado en el presente documento en la eliminación de tumores, en el que se usa una combinación de diana y célula efectora y en el que se usan dos combinaciones diferentes de concentración del anticuerpo. En el grupo A sólo se inyectan células tumorales; en el grupo B se inyectan células tumorales y monocitos; en el grupo C se inyectan células tumorales, monocitos, un anticuerpo antitumoral (ch4D5); en el grupo D se inyectan células tumorales, monocitos, anticuerpos antitumorales y un anticuerpo anti-FcγRII; en el grupo E se inyectan células tumorales, monocitos y un anticuerpo anti-FcγRIIB; en el grupo F se inyectan células tumorales, monocitos, Ch4D5 (N297A) e IgG1 humana. El experto en la técnica apreciará que pueden ensayarse diversas concentraciones de diversas combinaciones de anticuerpos en los modelos tumorales descritos. Preferentemente, se llevan a cabo estudios usando una línea celular de cáncer de mama, p. ej., SKBR3, en paralelo al experimento descrito anteriormente.

TABLA 3

8 ratones/grupo	Células tumorales s.c día 0	Monocitos i.p en el día 1	ch4D5 a 4 μg/g de mbw día 1 i.p.	ch4D5 N297A a 4 μg/g de mbw día 1 i.p	ch2B6 N297A a 4 μg/g de mbw día 1 i.p	IgG1 humana 4 μg/g de mbw día i.p
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

El criterio de valoración de los modelos tumorales de xenoinjerto se determina basándose en el tamaño de los tumores, el peso de ratones, el tiempo de supervivencia y el examen histoquímico e histopatológico del cáncer, usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Cada uno de los grupos de ratones de la Tabla 3 será evaluado. Preferentemente, los ratones se monitorizan tres veces por semana. Los criterios para el crecimiento tumoral pueden ser la distensión abdominal, la presencia de masas palpables en la cavidad peritoneal. Preferentemente, se calcularán estimaciones del peso del tumor frente a los días transcurridos desde la inoculación. Una comparación de los criterios mencionados anteriormente de los ratones del grupo D comparados con los de otros grupos definirá el papel de un anticuerpo de la invención en la potenciación de la eliminación de tumores. Preferentemente, los animales tratados con anticuerpo estarán bajo observación durante otros dos meses más que el grupo de control.

En realizaciones alternativas, pueden usarse ratones con FcγRIIB humano insertado que expresan FcγRIIB humano sobre células efectoras murinas para establecer la actividad *in vivo* de los anticuerpos divulgados en el presente

documento en lugar de transferir adoptivamente las células efectoras. Los ratones fundadores que expresan el FcγRIIB humano pueden generarse insertando el FcγRIIB humano en el locus de FcγRIIB de ratón. Después, los fundadores pueden cruzarse de nuevo sobre el antecedente atímico y expresarán el receptor FcγRIIB humano. Las células efectoras murinas resultantes expresarán receptores endógenos FcγRI y GcγRIIIA activadores y FcγRIIB humano inhibidor.

- 5 La actividad *in vivo* de los anticuerpos divulgados en el presente documento puede ensayarse además en un modelo murino de xenoinjerto con células derivadas de tumor primario humano, tales como células derivadas de carcinoma de mama y ovárico primario. Pueden ensayarse muestras de ascitis y derrame pleural de pacientes con cáncer para evaluar la expresión de Her2/neu, usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Las muestras de
10 pacientes con carcinoma ovárico pueden procesarse sedimentando por centrifugación la ascitis a 6370 g durante 20 minutos a 4 °C, lisando los glóbulos rojos y lavando las células con PBS. Una vez que se ha determinado la expresión de Her2/neu en las células tumorales, pueden seleccionarse dos muestras, una que exprese un nivel medio y otra alto, para la inoculación s.c. para establecer el modelo de tumor de xenoinjerto. La ascitis aislada se inyectará entonces i.p. en ratones para expandir las células. Pueden inyectarse aproximadamente 10 ratones i.p. y la ascitis de cada ratón se lleva a dos ratones para obtener ascitis de un total de 20 ratones que pueden usarse para inyectar un
15 grupo de 80 ratones. Las muestras de derrame pleural pueden procesarse usando un procedimiento similar al de la ascitis. Las células tumorales Her2/neu+ de muestras de derrame pleural pueden inyectarse en las almohadillas mamarias superior derecha e izquierda de los ratones.

En algunas realizaciones, si el porcentaje de células neoplásicas de las muestras de ascitis o derrame pleural es bajo en comparación con otros subgrupos celulares, las células neoplásicas puede expandirse *in vitro*. En otras
20 realizaciones, las células tumorales pueden purificarse usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo CC49 (anti-TAG-72) como se describe anteriormente, véase, p. ej., Barker y col., 2001, Gynecol. Oncol. 82:57, 63. Brevemente, pueden usarse perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo CC49 para separar las células tumorales ováricas que se desprenderán de las perlas mediante una incubación durante la noche a 37 °C. En algunas realizaciones, si las células tumorales carecen del antígeno TAG-72, puede usarse la depleción negativa usando un cóctel de anticuerpos, tales como los proporcionados por Stem Cell Technologies, Inc., Canadá, para enriquecer las
25 células tumorales.

En otras realizaciones, pueden usarse otros marcadores de tumores además de Her2/neu para separar células tumorales obtenidas a partir las muestras de ascitis y de derrame pleural de otras células no tumorales. En el caso del derrame pleural o tejido de mama, se ha informado recientemente de que pueden usarse como marcadores
30 CD44 (una molécula de adhesión), B38.1 (un marcador específico de cáncer de mama/ovario), CD24 (una molécula de adhesión), véase, p. ej., Al Hajj, y col., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983, 8. Una vez que se han purificado las células tumorales pueden inyectarse s.c. en ratones para expandirlas.

Preferentemente, se realiza inmunohistoquímica e histoquímica en ascitis y derrame pleural de pacientes para analizar las características estructurales de la neoplasia. Tales procedimientos son conocidos por el experto en la técnica y se engloban dentro de la divulgación. Los marcadores que pueden monitorizarse incluyen, por ejemplo, citoqueratina (para identificar células neoplásicas ováricas y mesoteliales de células inflamatorias y mesenquimales); calretinina (para separar células mesoteliales de neoplásicas positivas para Her2neu); y CD45 (para separar células inflamatorias del resto de la población celular de las muestras). Los marcadores adicionales que pueden seguirse incluyen CD3 (linfocitos T), CD20 (linfocitos B), CD56 (linfocitos NK) y CD14 (monocitos). El experto en la técnica
40 apreciará que los procedimientos de inmunohistoquímica e histoquímica descritos anteriormente se aplican de modo análogo a cualquier célula tumoral para su uso en los procedimientos de la divulgación. Después de la inoculación s.c. de células tumorales, se realiza un seguimiento de los cambios clínicos y anatómicos de los ratones. En caso necesario, pueden realizarse autopsias de los ratones para correlacionar la carga tumoral total con la localización específica en los órganos.

45 En una realización específica, se establecen los tumores usando células OVCAR-3 y ascitis de carcinoma ovárico humano. Preferentemente, la ascitis contiene tanto los efectores como las dianas tumorales para los anticuerpos que se está ensayando. La línea celular OVCAR-3 se transfiere preferentemente con monocitos como efectores. Después, estas dos fuentes de tumores ováricos pueden transferirse adoptivamente a ratones atímicos y NOD/SCID y puede determinarse la eliminación del tumor con anticuerpos específicos de tumor y anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento.
50

Preferentemente, las células OVCAR-3 se propagan en medio suplementado con 0,01 mg/ml de insulina bovina. Pueden inyectarse 2×10^6 células OVCAR-3 viables por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos lampiños y NOD-SCID de edad y peso concordantes con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede calcularse mediante la fórmula: longitud - (anchura)² / 2 y, preferentemente, no excede de 3 gramos. Un tumor dependiente de anclaje puede aislarse tras 6-8 semanas y pueden disociarse las células añadiendo 1 µg de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor tras incubarlo durante la noche. Las células pueden inyectarse después i.p. tumores para el establecimiento del modelo de xenoinjerto y ensayarse como dianas en ensayos de ADCC como se describe en el presente documento para ensayar una ADCC potenciada por anticuerpos anti-FcγRIIB divulgados en el presente documento.
55

60 Las inyecciones i.p. de preparaciones de células tumorales como se divulga anteriormente desarrollarán distensión

5 abdominal debida a la formación de ascitis, que se recogerá lavando la cavidad peritoneal para recoger células tumorales. Pueden inyectarse 10×10^6 células OVCAR-3 pasadas *in vivo* i.p. en el día 0 en ocho ratones por grupo como se muestra en la Tabla 4. Se ha informado de que la inyección de $11,5 \times 10^6$ células da como resultado una distensión abdominal visible en 40-50 días. Hamilton, Young, y col., 1983. A los 28 y 42 días después de la inyección de células tumorales, se coinyectarán anticuerpos terapéuticos, p. ej., ch4D5 y chCC49 (que se han preparado como se describe anteriormente), y un anticuerpo divulgado en el presente documento, p. ej., 2B6, a 2 µg y 5 µg por gramo de peso corporal de ratón para cada punto temporal. La inyección de anticuerpos antitumorales en dos puntos temporales antes del establecimiento del tumor permitirá evaluar la eliminación del tumor en varias fases de crecimiento, ya que la expresión óptima de los marcadores tumorales puede variar. Los grupos de ratones que no reciben anticuerpos serán inyectados con un control de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril.

TABLA 4 Establecimiento de un modelo de tumor en ratones

8 ratones por grupo	Células tumorales i.p. Día 0	Monocitos i.p. Día 26	Anticuerpo Ch CC49 2 µg/g de peso corporal de ratón Día 28	Anticuerpo anti-CD32B 2 µg/g de peso corporal de ratón Día 28
A	+	-	-	-
B	+	+	-	-
C	+	+	+	-
D	+	+	+	+
E	+	+	-	+

TABLA 5

	ANTICUERPOS	D	D1	D2	D3	C	C1	E	E1
DÍA 28	CC49	TABLA 2	2	5	5	TABLA 2	5	TABLA 2	0
	2B6	TABLA 2	5	2	5	TABLA 2	0	TABLA 2	5
DÍA 42	CC49	2	2	5	5	2	5	0	0
	2B6	2	5	2	5	0	0	2	5

15 Como se muestra en la Tabla 4 y 5, serán necesarios 10 grupos de 8 ratones cada uno para evaluar el papel del anticuerpo anti-FcyRIIB en la potenciación de la eliminación de tumores. En el grupo A se inyectan sólo células tumorales; en el grupo B se inyectan células tumorales y monocitos; en el grupo C se inyectan células tumorales, monocitos y un anticuerpo antitumoral; en el grupo D se inyectan células tumorales, un anticuerpo antitumoral, un anticuerpo anti-FcyRIIB y monocitos, y en el grupo E se inyectan células tumorales, un anticuerpo anti-FcyRIIB y monocitos. La comparación de los resultados obtenidos a partir del grupo D frente a los demás grupos de ratones definirá el papel de los anticuerpos anti-FcyRIIB en la potenciación de la tasa de eliminación del tumor.

25 En algunas realizaciones, puede usarse ascitis de pacientes con carcinoma ovárico como fuente de células tumorales para determinar la actividad *in vivo* de los anticuerpos divulgados en el presente documento. Pueden obtenerse aproximadamente 18-20 muestras de ascitis de carcinoma ovárico de las pacientes. El modelo de tumor de xenoinjerto puede establecerse después para tres muestras de ascitis de carcinoma ovárico. Estas muestras pueden procesarse centrifugando la ascitis a 2500 g durante 20 minutos a 4 °C; lisando los glóbulos rojos seguido de lavado de las células con PBS. Las células pueden procesarse como sigue: se tiñen los portaobjetos para el análisis histopatológico e inmunológico usando procedimiento conocidos por el experto en la técnica, antes de establecer el modelo de tumor de xenoinjerto para analizar el porcentaje de población de células neoplásicas frente a células efectoras y otros subgrupos celulares que pueden influir en el establecimiento del modelo de tumor. Tras la evaluación de las células neoplásicas y las células efectoras adecuadas en las muestras determinado mediante procedimientos inmunohistoquímicos, la ascitis puede inyectarse directamente por vía intraperitoneal en ratones atímicos y NOD-SCID para establecer los tumores. Pueden ensayarse después la eliminación del tumor y el papel de los anticuerpos anti-FcyRIIB como se describe anteriormente.

35

5.2.1 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

La presente divulgación incluye también polinucleótidos que codifican los anticuerpos divulgados en el presente documento (p. ej., anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6 o 3H7, con un número de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente) u otros anticuerpos monoclonales producidos mediante procedimientos de inmunización divulgados en el presente documento y sus versiones humanizadas y procedimientos para producirlos.

La presente divulgación engloba el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo de 2B6, con número de acceso de ATCC PTA-4591, como se divulga en la SEQ ID NO: 1. La presente también engloba el polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo de 2B6 con número de acceso de ATCC PTA-4591, como se divulga en la SEQ ID NO: 3.

Los procedimientos divulgados en el presente documento engloban también polinucleótidos que hibridan bajo diversas rigurosidades, p. ej. condiciones altamente rigurosas, condiciones de rigurosidad intermedia o más baja, con polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención. La hibridación puede realizarse bajo diversas condiciones de rigurosidad. A modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que usan condiciones poco rigurosas son las siguientes (véase también Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792). Los filtros que contienen ADN se pretratan durante 6 h a 40 °C en una solución que contiene formamida al 35 %, SSC 5X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,1 %, Ficoll al 0,1 %, BSA al 1 % y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma solución con las modificaciones siguientes: se usa PVP al 0,02 %, Ficoll al 0,02 %, BSA al 0,2 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, sulfato de dextrano al 10 % (p/v) y 5-20 X 10⁶ cpm de sonda marcada con ³²P. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40 °C y después se lavan durante 1,5 h a 55 °C en una solución que contiene SSC 2X, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1 %. La solución de lavado se reemplaza con solución recién preparada y se incuban otras 1,5 horas a 60 °C. Los filtros se secan con tejido absorbente y se exponen para autorradiografía. En caso necesario, los filtros se lavan por tercera vez a 65-68 °C y vuelvan a exponerse a la película. Otras condiciones poco rigurosas que pueden usarse son bien conocidas en la técnica (p. ej., como las empleadas para hibridaciones entre especies cruzadas). A modo de ejemplo y no de limitación, los procedimientos que usan condiciones muy rigurosas son los siguientes. Se lleva a cabo la prehibridación de filtros que contienen ADN durante de 8 h a toda la noche a 65 °C en tampón compuesto por SSC 6X, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02 %, Ficoll al 0,02 %, BSA al 0,02 % y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado. Los filtros se hibridan durante 48 h a 65 °C en mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado y 5-20 X 10⁶ cpm de sonda marcada con ³²P. El lavado de los filtros se realiza a 37 °C durante 1 h en una solución que contiene SSC 2X, PVP al 0,01 %, Ficoll al 0,01 % y BSA al 0,01 %. Esto va seguido por un lavado en SSC 0,1X a 50 °C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Otras condiciones muy rigurosas que pueden usarse son bien conocidas en la técnica. La selección de condiciones apropiadas para tales rigurosidades es bien conocida en la técnica (véase, p. ej., Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; véase también, Ausubel y col., ed., en la serie de manuales de técnicas de laboratorio de Current Protocols in Molecular Biology, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.; véase especialmente, Dyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis", en: Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Vol. 2, T.A. Brown, ed., pág. 111-156, IRL Press en Oxford University Press, Oxford, RU).

Pueden obtenerse los polinucleótidos y determinarse la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada (p. ej., una colección de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poli A+, aislado a partir de, cualquier célula o tejido que expresa el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para que expresen un anticuerpo de la invención, p. ej., 2B6 o 3H7) mediante hibridación con sondas específicas de Ig y/o amplificación por PCR usando cebadores sintéticos capaces de hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia génica concreta para identificar, p. ej., un clon de ADNc de una colección de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse después en vectores de clonación duplicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p. ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véanse, p. ej., las técnicas descritas en Sambrook y col., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y en Ausubel y col., ed., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una realización específica, se insertan una o más CDR dentro de regiones estructurales usando técnicas de ADN recombinante de rutina. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales naturales o de consenso y,

preferentemente, regiones estructurales humanas (véase, p. ej., Chothia y col., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para un listado de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado mediante la combinación de las regiones estructurales y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo une FcγRIIA. Preferentemente, como se analiza anteriormente, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones estructurales y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión de los anticuerpos de la invención a FcγRIIB.

En otra realización, las colecciones humanas o cualquier otra colección disponible en la técnica, pueden rastrearse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica para clonar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos divulgados en el presente documento.

5.2.2 Expresión recombinante de anticuerpos

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo divulgado en el presente documento, puede producirse el vector para la producción del anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción adecuadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y en Ausubel y col. ed., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (p. ej., electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y después las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo divulgado en el presente documento. En realizaciones específicas, la expresión del anticuerpo está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

Las células huésped usadas para expresar los anticuerpos recombinantes divulgados en el presente documento pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli* o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de inmunoglobulina totalmente recombinante. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking y col., 1998, Gene 45:101; Cockett y col., 1990, Bio/Technology 8:2).

Pueden utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped para expresar los anticuerpos divulgados en el presente documento. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de los anticuerpos y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas, expresar los anticuerpos divulgados en el presente documento *in situ*. Éstos incluyen, entre otros, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de inmunoglobulina; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de inmunoglobulina; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen las secuencias codificantes de inmunoglobulina; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de inmunoglobulina; o sistemas de células de mamíferos (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase el documento U.S. 5.807.715), células Per C.6 (células de retina de rata desarrolladas por Crucell)) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p. ej., promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7,5 K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse de forma ventajosa varios vectores de expresión en función del uso previsto para el anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos proteicos de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, entre otros, el vector de expresión de *E. coli* pURa78 (Ruther y col., 1983, EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede estar ligada individualmente dentro del vector en un marco con la región codificante de *lacZ* de forma que se produzca una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX pueden usarse también para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por absorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguida por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para que incluyan sitios de escisión por proteasa de trombina o factor Xa de forma que

el producto del gen diana clonado pueda ser liberado del resto GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de polihedrina) del virus y situarse bajo control de un promotor de AcNPV (p. ej., el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (p. ej., región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados (p. ej., véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Las señales de iniciación específicas también pueden ser necesarias para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto entero. Estas señales de control traduccional y codones de iniciación exógenos pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (Véase, Bittner y col., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Además, se puede elegir una cepa de células huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico de la manera deseada específica. Tales modificaciones (p. ej., glucosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y para la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huéspedes apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína exógena expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de proteínas recombinantes a largo plazo, de alto rendimiento, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo divulgado en el presente documento. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, pueden transformarse células huésped con ADN controlado mediante elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN exógeno, se puede dejar que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido dentro de sus cromosomas y crecer para formar focos, que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan los anticuerpos divulgados en el presente documento. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el rastreo y la evaluación de compuestos que interaccionan directamente o indirectamente con los anticuerpos divulgados en el presente documento

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluidos, pero sin limitarse a, los genes de la timidina cinasa del virus herpes simplex (Wigler y col., 1977, Cell, 11:223), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202) y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., 1980, Cell, 22:817), pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Asimismo, la resistencia antimetabolito puede usarse como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare y col., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 270:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11 (5): 155-215). Los procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y col. (ed.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (ed), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; Colberre-Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol., 150:1; e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y col., 1984, Gene 30:147).

Los niveles de expresión de un anticuerpo divulgado en el presente documento pueden incrementarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador del sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, un

incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de células huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también se incrementará (Crouse y col., 1983, Mol. Cell. Biol., 3:257).

5 La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión divulgados en el presente documento, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, lo cual permite una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un sólo vector que codifica polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; 10 Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que el anticuerpo divulgado en el presente documento se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, especialmente de afinidad por el 15 antígeno específico usando proteína A y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

5.3 Procedimientos profilácticos y terapéuticos

La divulgación engloba tratamientos a base de anticuerpos que implican administrar uno o más de los anticuerpos divulgados en el presente documento a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano, para evitar, tratar o mejorar síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, asociado con niveles anormales de FcγRIIB y/o tratable mediante la alteración de la función inmunitaria asociada con la actividad de FcγRIIB o potenciando la actividad citotóxica de un segundo anticuerpo terapéutico o potenciando la eficacia de una composición de vacuna. En algunas realizaciones, el tratamiento mediante la administración de uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento se combina con la administración de uno o más tratamientos, tales como, pero sin limitarse a, quimioterapias, tratamientos de radiación, tratamientos hormonales y/o tratamientos biológicos/inmunotratamientos. 20 25

Los compuestos profilácticos y terapéuticos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, moléculas proteínicas, incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluyendo proteínas modificadas postraduccionalmente, anticuerpos, etc.; moléculas pequeñas (menos de 1000 daltons), compuestos inorgánicos u orgánicos; moléculas de ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a, ADN bicatenario o monocatenario, ARN bicatenario o monocatenario, así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los compuestos profilácticos y terapéuticos pueden derivarse de cualquier organismo conocido (incluyendo, pero sin limitarse a, animales, plantas, bacterias, hongos y protistas o virus) o de una colección de moléculas sintéticas. 30

Los anticuerpos pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica o como se describe en el presente documento. Como se detalla a continuación, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en procedimientos para tratar el cáncer (en particular para potenciar el inmunotratamiento pasivo o la eficacia de una vacuna contra el cáncer), una enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios o alergias (p. ej., para potenciar la eficacia de una vacuna para el tratamiento de la alergia). 35

Los anticuerpos divulgados en el presente documento que funcionan como un agente profiláctico y/o terapéutico para una enfermedad, trastorno o infección pueden administrarse a un animal, preferentemente un mamífero y más preferentemente un ser humano, para tratar, evitar o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o infección. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden administrarse en combinación con uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles para tratar, evitar o controlar una enfermedad, trastorno o infección asociado con niveles o actividad de FcγRIIB anormales, y/o tratable mediante la alteración de la función inmunitaria asociada con la actividad de FcγRIIB. En algunas realizaciones, se administran uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento a un mamífero, preferentemente un ser humano, de forma concurrente con uno o más agentes terapéuticos distintos útiles para el tratamiento del cáncer. La expresión "de forma concurrente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que quiere decir que los anticuerpos de la invención y el otro agente se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden actuar conjuntamente con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administran de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deberían administrarse de forma suficientemente cercana en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, de cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. 40 45 50 55

En diversas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de

diferencia, con de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, con no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En realizaciones preferidas, se administran dos o más componentes en la misma visita del paciente.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento se engloban en las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Además, la dosificación y la frecuencia variarán normalmente en función de los factores específicos para cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico anterior del paciente. Los regímenes adecuados pueden ser seleccionados por un experto en la técnica teniendo en cuenta tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones de las que se informa en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, p. ej., IL-2, IL-3, IL-7), que, por ejemplo, sirven para incrementar el número o la actividad de las células efectoras que interactúan con los anticuerpos e incrementan la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección, tales como, p. ej., agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, agentes antivíricos, p. ej., como se detalla en las secciones, 5.4.6 y 5.4.5 que aparecen más adelante.

5.3.1 Cánceres

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con otros anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para evitar, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o la metástasis de células cancerosas. En una realización, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con anticuerpos usados en inmunotratamiento del cáncer. La invención engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con otro anticuerpo terapéutico para potenciar la eficacia de dicho inmunotratamiento incrementando la potencia de la función efectora del anticuerpo terapéutico, p. ej., ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, los anticuerpos divulgados en el presente documento bloquean FcγRIIB, preferentemente en monocitos y macrófagos y potencian así los beneficios terapéuticos y la eficacia clínica de anticuerpos específicos de tumor, por ejemplo, potenciando la eliminación de los tumores mediada por FcγR activadores. En consecuencia, la divulgación proporciona procedimientos para evitar o tratar el cáncer caracterizado por un antígeno canceroso, cuando se administra en combinación con otro anticuerpo que une específicamente un antígeno canceroso y que es citotóxico. Los anticuerpos divulgados en el presente documento son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, especialmente para potenciar la actividad citotóxica de anticuerpos terapéuticos específicos de antígeno canceroso con actividad citotóxica para potenciar la destrucción de células tumorales por los anticuerpos de la invención y/o potenciar, por ejemplo, la actividad ADCC o la actividad CDC de los anticuerpos terapéuticos. En una realización específica, un anticuerpo divulgado en el presente documento, cuando se administra solo o en combinación con un anticuerpo terapéutico citotóxico, inhibe o reduce el crecimiento de un tumor primario o la metástasis de células cancerosas en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 35 %, al menos 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % en relación con el crecimiento del tumor primario o la metástasis en ausencia de dicho anticuerpo. En una realización preferida, los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con un anticuerpo terapéutico citotóxico inhiben o reducen el crecimiento de un tumor primario o la metástasis de células cancerosas en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 35 %, al menos 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % en relación con el crecimiento primario o la metástasis en ausencia de dichos anticuerpos.

La transición desde un estado normal a uno maligno es un proceso en varias etapas que implica cambios genéticos y epigenéticos. De hecho, se producen numerosas modificaciones en los circuitos de regulación celular que facilitan esta progresión que permite que las células tumorales eludan el compromiso de diferenciación terminal y la inactividad que normalmente regula la homeostasis tisular. Algunos genes se han implicado en la invasividad y el potencial metastásico de células cancerosas tales como CSF-1 (factor estimulante de colonias 1 o factor estimulante de colonias de macrófagos). Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, el CSF-1 puede mediar la progresión del tumor y la metástasis reclutando macrófagos al sitio del tumor, donde promueven la progresión del tumor. Se cree que los macrófagos tienen un papel trófico en la mediación de la progresión tumoral y la metástasis tal vez mediante la secreción de factores angiogénicos, p. ej., timidina fosforilasa, factor de crecimiento derivado del endotelio vascular; la secreción de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico, que podrían actuar como un factor paracrino en células tumorales y, así, promover la migración de células tumorales y

la invasión en los vasos sanguíneos. (Véanse, p. ej., Lin y col., 2001, J. Exp. Med. 193(6): 727-739; Lin y col., 2002, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasm 7(2): 147-162; Scholl y col., 1993, Molecular Carcinogenesis, 7: 207-11; Clynes y col., 2000, Nature Medicine, 6(4): 443-446; Fidler y col., 1985, Cancer Research, 45: 4714-26).

5 La divulgación engloba usar los anticuerpos divulgados en el presente documento para bloquear la metástasis y la progresión de células tumorales mediada por macrófagos. Los anticuerpos son especialmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, donde se produce infiltración de macrófagos. Los anticuerpos antagonistas son especialmente útiles para controlar, p. ej., reducir o eliminar, la metástasis de células tumorales, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que se ubica en el sitio tumoral. En algunas realizaciones, los anticuerpos se usan solos para controlar la metástasis de células tumorales. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, los anticuerpos antagonistas, cuando se administran solos unen el FcγRIIB inhibitor en macrófagos y reducen eficazmente la población de macrófagos y, de este modo, restringen la progresión de células tumorales. Los anticuerpos antagonistas reducen o, preferentemente, eliminan macrófagos que se localizan en el sitio del tumor. En algunas realizaciones, los anticuerpos se usan en el tratamiento de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de CSF-1, incluyendo, pero sin limitarse a, cánceres de mama, de útero y ovárico.

15 La divulgación engloba además anticuerpos que deplecionan o eliminan de forma eficaz células efectoras inmunitarias distintas de macrófagos que expresan FcγRIIB, p. ej., células dendríticas. La depleción o la eliminación eficaz de células efectoras inmunitarias usando los anticuerpos pueden variar desde una reducción de la población de células efectoras en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, preferentemente 90 % y lo más preferentemente 99 %. Por tanto, los anticuerpos tienen eficacia terapéutica potenciada bien solos o en combinación con un segundo anticuerpo, p. ej., un anticuerpo terapéutico, tal como anticuerpos antitumorales, anticuerpos antivíricos y anticuerpos antimicrobianos. En algunas realizaciones, los anticuerpos terapéuticos tienen especificidad por una célula cancerosa o una célula inflamatoria. En otras realizaciones, el segundo anticuerpo une una célula normal. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, cuando los anticuerpos divulgados en el presente documento se usan solos para deplecionar células efectoras que expresan FcγRIIB, la ruta de señalización mediada por receptores de Fc activadores se potencia eficazmente. Cuando se se usa en combinación con un segundo anticuerpo, p. ej., un anticuerpo terapéutico, la eficacia del segundo anticuerpo se potencia incrementado la función efectora mediada por Fc del anticuerpo.

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante procedimientos y composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas, tales como, pero sin limitarse a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfoma tales como, pero sin limitarse a, enfermedad hodgkiniana, enfermedad no hodgkiniana; mielomas múltiples, tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple smordeling, mieloma de secreción intermitente, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado incierto; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y del tejido conjuntivo, tales como, pero sin limitarse a, sarcoma de hueso, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióístico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales, incluyendo, pero sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco cerebral, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (microcítico), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer papilar de mama, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero sin limitarse a, cáncer papilar o folicular de tiroides, cáncer medular de tiroides y cáncer anaplásico de tiroides; cáncer pancreático, incluyendo, pero sin limitarse a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, somatostatina y tumor de los islotes celulares o carcinoide; cánceres de la pituitaria, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, prolactinoma, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares, incluyendo, pero sin limitarse a, melanomas oculares, tales como melanoma del iris, melanoma coroides y melanoma del cuerpo ciliar, retinoblastoma; cánceres vaginales, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres cervicouterinos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres ováricos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma ovárico epitelial, tumor de bajo potencial maligno (borderline), tumor de células germinales y tumor estromal; cáncer esofágico incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoceludermode, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de células de avena (microcítico); cánceres de estómago, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulcerante, de extensión superficial, de extensión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres

de la vesícula biliar, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas, incluyendo, pero sin limitarse a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de microcítico; cánceres testiculares, incluyendo, pero sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatoocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, teratoma carcinoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino); cánceres de próstata, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiocarcinoma y rhabdomiocarcinoma; cánceres del pene; cánceres orales, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma quístico adenoide; cánceres de faringe, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas y verrucoso; cánceres de la piel, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma acral lentiginoso; cánceres renales, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (renales, de la pelvis y/o el uréter); tumor de Wilm; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman y col., 1985, *Medicine*, 2ª Ed., J.B. Lippincott. Co., Philadelphia y Murphy y col., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos).

En consecuencia, los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento son también útiles para tratar o evitar una variedad de cánceres o u otras enfermedades proliferativas anormales, incluyendo (pero sin limitarse a) las siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt, tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannoma; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres provocados por alteraciones en la apoptosis puedan tratarse mediante los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento. Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, los cambios disproliferativos o en la malignidad (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, se tratan o evitan mediante los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, el páncreas o el útero. En otras realizaciones específicas, se tratan o evitan el sarcoma, el melanoma o la leucemia mediante los procedimientos y composiciones de la invención.

Los cánceres asociados con los antígenos cancerosos pueden tratarse o evitarse mediante la administración de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con un anticuerpo que une el antígeno canceroso y que es citotóxico. En una realización concreta, los anticuerpos divulgados en el presente documento potencian el efecto citotóxico mediado por anticuerpos del anticuerpo dirigido al antígeno canceroso concreto. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los antígenos cancerosos siguientes pueden tratarse o evitarse mediante los procedimientos y composiciones de la invención: antígeno de pancarcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142:32-37; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4):407-415), antígeno de carcinoma ovárico (CA125) (Yu y col., 1991, *Cancer Res.* 51(2):48-475), fosfato ácido prostático (Tailor y col., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18 (1):4928), antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli y col., 1993, *Cancer Res.* 53:227-230), antígeno asociado con melanoma p97 (Estin y col., 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6): 445-44), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl y col., 1990, *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali y col., 1987, *Cancer* 59:55-3; Mittelman y col., 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon y col., 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13:294), antígeno de la mucina epitelial polimórfica, antígeno globular de la grasa de la leche humana, antígenos asociados con tumores colorrectales, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata y col., 1992, *Cancer Res.* 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar y col., 1993, *Int. J. Cancer* 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn y col., 1982, *J. Clin. Immunol.* 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie y col., 1994, *Blood* 83:1329-1336), antígeno del linfoma-B humano CD20 (Reff y col., 1994, *Blood* 83:435-445), CD33 (Sgouros y col., 1993, *J. Nucl. Med.* 34:422-430), antígenos específicos de melanoma, tales como gangliósido GD2 (Saleh y col., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y col., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston y col., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y col., 1993, *Cancer Res.* 53:5244-5250), antígeno de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo virus tumorales de ADN de antígeno T y antígenos de

envuelta de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom y col., 1985, *Cancer. Res.* 45:2210-2188), antígenos de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom y col., 1986, *Cancer Res.* 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de leucemia de linfocitos T humana Gp37 (Bhattacharya-Chat-tetjee y col., 1988, *J. of Immun.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens y col., 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17:359), antígeno de linfocito humano maligno APO-1 (Bernhard y col., 1989, *Science* 253: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314:53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos y el endodermo primario fetales, I(Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39, que se encuentran en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D₁56-22, que se encuentran en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14, que se encuentran en adenocarcinoma de colon, F3, que se encuentra en adenocarcinoma pulmonar, AH6, que se encuentra en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y, que se encuentra en células de carcinoma embrionarias, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF, que se encuentran en células A431, la serie E_i (grupo sanguíneo B), que se encuentran en cáncer pancreático, FC10.2, que se encuentra en células de carcinoma embrionarias, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a), que se encuentra en adenocarcinoma, NS-10, que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor de EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y), que se encuentran en adenocarcinoma de colon, 19.9, que se encuentra en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇, que se se encuentra en células mieloides, R₂₄, que se encuentran en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8, que se encuentran en células de carcinoma embrionarias y SSEA-3, SSEA-4, que se encuentran en embriones en fase de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de linfocitos T a partir de un linfoma de linfocitos T cutáneo (véase, Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con cualquier anticuerpo terapéutico para el cáncer conocido en la técnica para potenciar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse con cualquiera de los anticuerpos de la Tabla 3, que han mostrado utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos divulgados en el presente documento potencian la eficacia del tratamiento de los anticuerpos terapéuticos frente al cáncer potenciando al menos una función efectora mediada por anticuerpos de dichos anticuerpos terapéuticos frente al cáncer. En una realización concreta, los anticuerpos potencian la eficacia del tratamiento potenciando la cascada dependiente del complemento de dichos anticuerpos terapéuticos frente al cáncer. En otra realización de la divulgación, los anticuerpos divulgados en el presente documento potencian la eficacia del tratamiento potenciando la fagocitosis y la opsonización de las células tumorales a las que se dirigen. En otra realización divulgada en el presente documento, los anticuerpos potencian la eficacia del tratamiento potenciando la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("ADCC") para la destrucción de las células tumorales a las que se dirigen.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con productos a base de dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando actualmente como activadores de respuestas inmunitarias innatas y adquiridas. Por ejemplo, la divulgación engloba el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento para tratar y/o evitar el cáncer (véanse también Warren y col., 2002, *Semin Oncol.*, 29(1, Supl. 2):93-7; Warren y col., 2000, *Clin Lymphomas*, 1(1):57-61).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con un anticuerpo terapéutico que no media su efecto terapéutico a través de la destrucción de células para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. En una realización específica, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con un anticuerpo terapéutico inductor de apoptosis con actividad agonista, p. ej., un anticuerpo anti-Fas. Los anticuerpos anti-Fas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, Jo2 (Ogasawara y col., 1993, *Nature* 364: 806) y HFE7 (Ichikawa y col., 2000, *Int. Immunol.* 12: 555). Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, FcγRIIB se ha implicado en la promoción de la apoptosis mediada por anti-Fas, véase, p. ej., Xu y col., 2003, *Journal of Immunology*, 171: 562-568. De hecho, el dominio extracelular de FcγRIIB puede servir como un agente de entrecruzamiento para receptores de Fas, conduciendo a un complejo funcional y promoviendo la apoptosis dependiente de Fas. En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento bloquean la interacción de anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, conduciendo a una reducción de la actividad apoptótica mediada por Fas. Los anticuerpos divulgados en el presente documento que dan como resultado una reducción de la actividad apoptótica mediada por Fas son especialmente útiles en combinación con anticuerpos anti-Fas que tienen efectos secundarios no deseados, p. ej., hepatotoxicidad. En otras realizaciones, los anticuerpos potencian la interacción de anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, conduciendo a una potenciación de la actividad apoptótica mediada por Fas. La combinación de los anticuerpos divulgados en el presente documento con anticuerpos terapéuticos inductores de apoptosis con actividad agonista tiene una eficacia terapéutica potenciada.

Los anticuerpos terapéuticos inductores de apoptosis usados en los procedimientos divulgados en la presente invención pueden ser específicos para cualquier receptor de muerte conocido en la técnica para la modulación de rutas apoptóticas, p. ej., la familia de receptores TNFR.

La divulgación proporciona un procedimiento para tratar enfermedades con señalización mediada por apoptosis deficiente, p. ej., cáncer, enfermedad autoinmunitaria. En una realización específica, la divulgación engloba un

procedimiento para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, comprendiendo dicho procedimiento administrar un anticuerpo divulgado en el presente documento en combinación con un anticuerpo anti-Fas.

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento son especialmente útiles para el tratamiento de tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, la eficacia de los anticuerpos agonistas se debe, en parte, a la activación de la ruta inhibidora de FcγRIIB, ya que los tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma, expresan FcγRIIB. De hecho, experimentos recientes han demostrado que la expresión de FcγRIIB en células de melanoma modula el crecimiento tumoral mediante interacción directa con anticuerpos antitumorales (p. ej., uniendo la región Fc de los anticuerpos antitumorales) de un modo intracitoplásmico dependiente (Cassard y col., 2002, *Journal of Clinical Investigation*, 110(10): 1549-1557).

15 En algunas realizaciones, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con anticuerpos terapéuticos que unen inmunoespecíficamente antígenos tumorales que no se expresan en las células tumorales mismas, sino en las células no malignas de apoyo del tumor, reactivas, circundantes, que comprenden el estroma tumoral. El estroma tumoral comprende células endoteliales que forman nuevos vasos sanguíneos y fibroblastos estromales que rodean la vasculatura tumoral. En una realización específica, un anticuerpo divulgado en el presente documento se usa en combinación con un anticuerpo que une inmunoespecíficamente un antígeno tumoral o una célula endotelial. En una realización preferida, un anticuerpo divulgado en el presente documento se usa en combinación con un anticuerpo que une inmunoespecíficamente un antígeno tumoral en un fibroblasto, p. ej., la proteína de activación de fibroblastos (FAP). FAP es una glucoproteína de tipo II homodimérica de 95 KDa que se expresa altamente en fibroblastos estromales de muchos tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de pulmón, de mama y colorrectales. (Véase, p. ej., Scanlan y col., 1994, *Proc. Natl. Acad. EE. UU.*, 91: 5657-61; Park y col., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 36505-12; Rettig y col., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3110-3114; Garin-Chesea y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7235-7239). Los anticuerpos que unen FAP inmunoespecíficamente son conocidos en la técnica y se engloban dentro de la divulgación, véanse, p. ej., Wuest y col., 2001, *Journal of Biotechnology*, 159-168; Mersmann y col., 2001, *Int. J. Cancer*, 92: 240-248; la patente de EE. UU. N.º 6.455.677.

30 Recientemente, se han implicado las IgE como mediadores del crecimiento tumoral y, de hecho, las reacciones de inflamación alérgica y de hipersensibilidad inmediata dirigidas por IgE se han propuesto como posibles mecanismos naturales implicados en respuestas antitumorales (para una revisión, véanse, p. ej., Mills y col., 1992, *Am. Journal of Epidemiol.* 122: 66-74; Eriksson y col., 1995, *Allergy* 50: 718-722). De hecho, un estudio reciente ha demostrado que cargar células tumorales con IgE reduce el crecimiento del tumor, conduciendo, en algunos casos, al rechazo del tumor. De acuerdo con el estudio, las células tumorales cargadas con IgE no sólo poseen un potencial terapéutico, sino que también confieren inmunidad antitumoral a largo plazo, incluyendo la activación del mecanismo efector de la inmunidad innata y la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos T, véase Reali y col., 2001, *Cancer Res.* 61: 5516-22; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los anticuerpos antagonistas divulgados en el presente documento pueden usarse para tratar y/o evitar el cáncer en combinación con la administración de IgE con el fin de potenciar la eficacia del tratamiento del cáncer mediado por IgE. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, los anticuerpos potencian la eficacia terapéutica del tratamiento con IgE de tumores, bloqueando la ruta inhibidora. Los anticuerpos antagonistas pueden potenciar la eficacia terapéutica del tratamiento del cáncer mediado por IgE, (i) potenciando el retraso del crecimiento del tumor; (ii) potenciando la disminución de la velocidad de progresión del tumor; (iii) potenciando el rechazo del tumor; o (iv) potenciando la inmunidad protectora en relación con el tratamiento del cáncer con IgE sola.

45 Los tratamientos para el cáncer y su dosis, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía, véase, p. ej., *Physician's Desk Reference* (56ª ed., 2002).

5.3.2 Neoplasias malignas de linfocitos B

50 Los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento son útiles para tratar o evitar cualquier tipo de neoplasia maligna de linfocitos B, en particular, linfoma no hodgkiniano y leucemia linfocítica crónica. FcγRIIB, es una diana para la desregulación mediante translocación cromosómica en linfomas malignos, en particular en linfoma no hodgkiniano de linfocitos B (véase Callanan M.B. y col., 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (1):309-314). Por tanto, los anticuerpos divulgados en el presente documento son útiles para tratar o evitar cualquier leucemia linfocítica crónica del linaje de linfocitos B. Las leucemias linfocíticas crónicas del linaje de linfocitos B se revisan por Freedman (véase la revisión por Freedman, 1990, *Hemtaol. Oncol. Clin. North Am.* 4:405). Aunque sin pretender quedar ligados a ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento inhiben o evitan las neoplasias malignas de linfocitos B inhibiendo la proliferación y/o la activación de linfocitos B. La invención también engloba el uso de los anticuerpos agonistas en combinación con otros tratamientos conocidos (p. ej., quimioterapia y radioterapia) en la técnica para evitar y/o tratar neoplasias malignas de linfocitos B. La invención también engloba el uso de los anticuerpos agonistas en combinación con otros anticuerpos conocidos en la técnica para tratar y/o evitar neoplasias malignas de linfocitos B. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas de la invención pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-C22 o anti-CD 19 divulgados por Goldenberg y col. (documento U.S. 6.306.393).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con Oncoscint (diana: CEA), Verluma (diana: GP40), Proscint (diana: PSMA) CEA-SCAN (diana: CEA), Rituxin (diana: CD20), Herceptin (diana: HER-2), Campath (diana: CD52), Mylotarge (diana: CD33) y Zevalin (diana: CD20).

5.3.3 Enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias

5 Los anticuerpos agonistas divulgados en el presente documento pueden usarse para tratar o evitar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. La divulgación proporciona procedimientos para evitar, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio en un sujeto, comprendiendo la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o sus fragmentos divulgados en el presente documento. La divulgación también proporciona procedimientos para evitar, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto, comprendiendo además la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. La divulgación también proporciona procedimientos para evitar, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, comprendiendo además la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.4.5 proporciona ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

20 Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para tratar y/o evitar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. En la Tabla 6A se presenta un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para tratar o evitar de trastornos inflamatorios y en la Tabla 6B se presenta un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para tratar o evitar un trastorno autoinmunitario. Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden, por ejemplo, potenciar la eficacia del tratamiento de los anticuerpos terapéuticos presentados en las Tablas 6A y 6B. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden potenciar la respuesta inmunitaria en el sujeto que se está tratando con cualquiera de los anticuerpos de las Tablas 6A o 6B.

25 Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con Orthoclone OKT3, ReoPro, Zenapex, Simulec, Synagis y Remicade.

30 Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con productos a base de dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando actualmente como activadores de respuestas inmunitarias innatas y adquiridas. Por ejemplo, la divulgación engloba el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceutical) en los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento para tratar y/o evitar trastornos autoinmunitarios o inflamatorios (Weeratna y col., 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71).

35 Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse administrando los anticuerpos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, orquitis y ovaritis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, crioaglutinina, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, síndrome de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por inmunidad o de tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica debida a infecciones víricas o bacterianas crónicas. Como se describe en la sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios están asociadas con una afección inflamatoria. Así, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunitarios también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden evitarse, tratarse o controlarse de acuerdo con los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica debida a infecciones víricas o bacterianas crónicas.

60 Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse también para reducir la inflamación experimentada por animales, en particular mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, un

5 anticuerpo reduce la inflamación en un animal en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % en relación con la inflamación en un animal al que no se le ha administrado dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos reduce la inflamación en un animal en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % en relación con la inflamación en un animal al que no se le ha administrado dichos anticuerpos.

10 Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse también para evitar el rechazo de trasplantes.

TABLA 6A: Anticuerpos frente a enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias que pueden usarse en combinación con los anticuerpos divulgados en el presente documento.

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isótopo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	LES
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
SG1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjertos
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athene/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo de aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	LES
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	selectina E	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2C	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Apoplejía
IC14	CD14	?		ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	LES
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple

ES 2 381 617 T3

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isótopo	Patrocinadores	Indicación
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/ GlaxoSmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/Alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	Integrina beta-2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Apoplejía
LDP-01	Integrina beta	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo de aloinjertos
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centocor	Trastornos autoinmunitarios hematológicos
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjertos
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
Orthoclone/ anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjertos
RepPro/ Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/ Tanox Biosystems	Asma/Alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjertos
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjertos
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjertos

Tabla 6B: Anticuerpos frente a trastornos autoinmunitarios

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo frente al antígeno CBL de linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK anticuerpo completamente humano de Xenomouse
IL1-ra	artritis reumatoide	proteína recombinante antiinflamatoria
sTNF-RI	enfermedad inflamatoria crónica artritis reumatoide	factor de necrosis tumoral a soluble - receptor de tipo I bloquea la acción del TNF
5c8 (anticuerpos anti ligando CD-40)	los ensayos en fase II se detuvieron en octubre de 1999 examinar "acontecimientos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus sistémico eritematoso (LES)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	psoriasis	primatizado anti-CD80
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple Enfermedad de Crohn psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (Acm anti-b7))	enfermedad inflamatoria intestinal enfermedad de Crohn colitis ulcerosa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
Anticuerpo SMART anti-interferón gamma	trastornos autoinmunitarios	anti-interferón gamma
Verteporfin	artritis reumatoide	
Thalomid (talidomida)	lepra - aprobado para el mercado enfermedad de Crohn artritis reumatoide	inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa)
SeICID (fármacos selectivos inhibidores de citocinas)		inhibidores altamente específicos de la enzima fosfodiesterasa de tipo 4 (PDE-4) incrementa los niveles de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) activa la proteína cinasa A (PKA) bloquea el factor de transcripción NK-kB evita la transcripción del gen TNF-a reduce la producción de TNF-a
IMiD (fármacos inmunomoduladores)	trastornos autoinmunitarios generales	análogos estructurales de la talidomida inhiben TNF-a
MDX-33	trastornos sanguíneos provocados por reacciones autoinmunitarias Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) anemia hemolítica autoinmunitaria	anticuerpo monoclonal frente a receptores FcRI
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otras autoinmunitades	anticuerpo monoclonal frente a la molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunitarios esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria intestinal lupus psoriasis	inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para preparar ARN y ADN nuevos usados en la producción de nucleótidos necesarios para la

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de la interleucina-1 beta ICE (enzima conversora, controla rutas que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva, regula citocinas)
VX-745	específico para la inflamación implicado en la señalización química de la respuesta inmunitaria inicio y progresión de la inflamación	inhibidor de la proteína cinasa activada por mitógenos P38MAP cinasa
Enbrel (etanercept)		se dirige a TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		AcM completamente humanos frente a IL-8 (interleucina 8) (bloquea IL-8 bloquea la respuesta inflamatoria)
5G1.1	artritis reumatoide penfigoide (erupción cutánea peligrosa) psoriasis	inhibidor del complemento C5 a
Apogen MP4		antígeno recombinante destruye selectivamente los linfocitos T asociados con enfermedad induce la apoptosis los linfocitos T eliminados por muerte celular programada dejan de atacar a las células propias del organismo apoptógenos específicos se dirigen a linfocitos T específicos

Clasificación de empresas	Producto	Fase de desarrollo
Immunex	<u>Enbrel</u>	en el mercado
Amgen	<u>IL1-ra, sTNF-R1</u>	Fase II/III
Abgenix	<u>AGX-RB2, IL-8</u>	preclínico, Fase I
Alexion	<u>5G1.1, Apogen MP4</u>	Fase II, preclínico
Biogen	<u>5c8</u>	Fase II (detenido)
IDEC	<u>131, 151, 152, 114</u>	Fase I y II
MedImmune	<u>MEDI 507</u>	Fase I/II
Millennium	<u>LDP-02</u>	Fase II

Clasificación de empresas	Producto	Fase de desarrollo
Protein Design Labs	<u>Anti-Interferón Gamma</u>	preclínico
Medarex	<u>MDX-33, MDX-CD4</u>	Fase II, Fase I
QLT PhotoTherapeutics	<u>Verteportin</u>	Fase I
Celegene	<u>Thalomid, SelCID, IMiD</u>	en el mercado, preclínico
Vertex	<u>VX-497, VX-740, VX-745</u>	Fase II, Fase II, Fase II

5.3.4 Alergia

La divulgación proporciona procedimientos para tratar o evitar un trastorno mediado por IgE y/o FcεRI en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos agonistas o sus fragmentos divulgados en el presente documento. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, los anticuerpos divulgados en el presente documento son útiles para inhibir la activación de mastocitos inducida por FcεRI, que contribuye a las respuestas alérgicas de fase aguda y tardía (Metcalfe D. y col. 1997, *Physiol. Rev.* 77:1033). Preferentemente, los anticuerpos agonistas tienen una eficacia terapéutica potenciada y/o efectos secundarios reducidos en comparación con los procedimientos convencionales usados en la técnica para tratar y/o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE. Los procedimientos convencionales para tratar y/o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios (p. ej., corticosteroides orales e inhalados para el asma), antihistamínicos (p. ej. para rinitis alérgica y dermatitis atópica), cisteinil leucotrienos (p. ej., para el tratamiento del asma); anticuerpos anti-IgE; e inmunotratamiento específico o desensibilización.

Los ejemplos de respuestas alérgicas mediadas por IgE incluyen, pero no se limitan a, asma, rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, eosinofilia, conjuntivitis, dermatitis atópica, urticaria, anafilaxia o nefritis glomerular.

La divulgación engloba moléculas, p. ej., inmunoglobulinas, manipuladas para que formen complejos con FcεRI y FcγRIIB humanos, es decir, que unan específicamente FcεRI y FcγRIIB humanos. Preferentemente, tales moléculas tienen eficacia terapéutica en trastornos mediados por IgE y FcεRI. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, la eficacia terapéutica de estas moléculas manipuladas se debe, en parte, a su capacidad para inhibir la función de mastocitos y basófilos.

En una realización específica, las moléculas que unen específicamente FcεRI y FcγRIIB humanos son proteínas de fusión quiméricas que comprenden un sitio de unión para FcεRI y un sitio de unión para FcγRIIB. Tales moléculas pueden manipularse de acuerdo con metodologías de ADN recombinante estándar conocidas por el experto en la técnica. En una realización específica preferida, una proteína de fusión quimérica para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento comprende una cadena sencilla F(ab') de un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento fusionada con una región usada como un puente para enlazar el huFcε con la región C-terminal de la cadena sencilla F(ab') del anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB. Una proteína de fusión quimérica ejemplar para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento comprende lo siguiente: V_L/C_H (FcγRIIB)-bisagra-V_H/C_H (FcγRIIB)-ENLAZADOR-C_Hε2-C_Hε3-C_Hε4. El enlazador para las moléculas quiméricas puede tener una longitud de cinco, diez, preferentemente 15, aminoácidos. La longitud del enlazador puede variar para proporcionar una unión óptima de la molécula a FcγRIIB y FcεRI. En una realización específica, el enlazador es una enlazador de 15 aminoácidos, que consiste en la secuencia: (Gly₄Ser)₃. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, el enlazador peptídico flexible facilita el emparejamiento de cadenas y minimiza el posible replegamiento y también permitirá que la molécula quimérica alcance los dos receptores, es decir, FcγRIIB y FcεRI, sobre las células y los entrecruce. Preferentemente, la molécula quimérica se clona en un vector de expresión de mamífero, p. ej., pCI-neo, con un promotor compatible, p. ej., el promotor del citomegalovirus. La proteína de fusión preparada de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento contendrá el sitio de unión para FcεRI (CH₂2CH₃) y para FcγRIIB (VL/CL,-bisagra-VH/CH). El ácido nucleico que codifica la proteína de fusión preparada de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento se transfiere, preferentemente, en células 293 y la proteína segregada se purifica usando procedimientos comunes conocidos en la técnica.

La unión de las moléculas quiméricas a FcεRI y FcγRIIB humanos puede evaluarse usando procedimientos comunes conocidos por el experto en la técnica para determinar la unión a un FcγR. Preferentemente, las moléculas quiméricas divulgadas en el presente documento tienen eficacia terapéutica para tratar trastornos mediados por IgE, por ejemplo, inhibiendo la desgranulación dirigida por antígenos y la inhibición de la activación celular. La eficacia de las moléculas quiméricas divulgadas en el presente documento en el bloqueo de la desgranulación de mastocitos mediada por FcεRI dirigida por IgE puede determinarse en ratones transgénicos, que se han manipulado para que expresen FcγRIIB

humano y FcεRα humano, antes de su uso en seres humanos.

La divulgación proporciona el uso de anticuerpos biespecíficos para tratar y/o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE y/o mediados por FcεRI. Un anticuerpo biespecífico (AcBs) se une a dos epítomos diferentes, habitualmente en antígenos distintos. Los AcBs tienen utilidad clínica potencial y se han usado para marcar virus, células infectadas víricamente y patógenos bacterianos, así como para administrar agentes trombolíticos a coágulos sanguíneos (Cao Y., 1998 Chem 9: 635-644; Koelemij y col., 1999, J. Immunother., 22, 514-524; Segal y col., Curr. Opin. Immunol., 11, 558-562). La tecnología para la producción de IgGBs y otras moléculas biespecíficas relacionadas está disponible (véase, p. ej., Carter y col., 2001, J. of Immunol. Methods, 248, 7-15; Segal y col., 2001, J. of Immunol. Methods, 248, 7-15). La divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos que contienen un F(ab') del anticuerpo anti-FcγRIIB y un F(ab') de un anticuerpo monoclonal anti-hulGE disponible que agrega dos receptores, FcγRIIB y FcεRI, sobre la superficie de la misma célula. Puede emplearse cualquier metodología conocida en la técnica y divulgada en el presente documento para generar anticuerpos biespecíficos para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento. En una realización específica, los AcBs se producirán por entrecruzamiento químico de fragmentos F(ab') de un anticuerpo anti-FcγRIIB y un anticuerpo anti-hulGE como se describe anteriormente, véase, p. ej., Glennie y col., 1995, Tumor Immunobiology, Oxford University press, Oxford, pág. 236). Los fragmentos F(ab') pueden producirse por proteólisis limitada con pepsina y reducirse con mercaptoetanolamina para proporcionar fragmentos Fab' con grupos sulfhidrilos (SH) libres de la región bisagra. El grupo SH en uno de los fragmentos Fab'(SH) puede alquilarse con un exceso de O-fenilendimaleimida (O-PDM) para proporcionar un grupo maleimida (mal) libre. Las dos preparaciones Fab'(mal) y Fab'(SH) pueden combinarse en una proporción adecuada, preferentemente 1:1, para generar construcciones heterodiméricas. Los AcBs pueden purificarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño y caracterizarse por HPLC usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

En particular, la divulgación engloba anticuerpos biespecíficos que comprenden una primera pareja de cadena pesada-cadena ligera que une FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicha pareja de cadena pesada-cadena ligera une FcγRIIA y una segunda pareja de cadena pesada-cadena ligera que une el receptor de IgE, con la condición de que dicha primera pareja de cadena pesada-cadena ligera une FcγRIIB en primer lugar. Los anticuerpos biespecíficos pueden manipularse usando técnicas estándar conocidas en la técnica para asegurar que la unión a FcγRIIB precede a la unión al receptor de IgE. El experto en la técnica entenderá la manipulación de los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, de modo que dichos anticuerpos biespecíficos unan FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos unen el receptor de IgE. Adicionalmente, los anticuerpos biespecíficos pueden manipularse mediante técnicas conocidas en la técnica, de modo que el tamaño de la bisagra del anticuerpo puede incrementarse en su longitud, por ejemplo, añadiendo un enlazador, para proporcionar a los anticuerpos biespecíficos flexibilidad para unir el receptor de IgE y el receptor FcγRIIB sobre la misma célula.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden usarse en combinación con otros fármacos o anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para tratar o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en combinación con cualquiera de los siguientes: azelastina, Astelin, inhalador de dipropionato de beclometasona, Vanceril, pulverizador/inhalador nasal de dipropionato beclometasona, Vancenase, pulverizador/inhalador nasal de budesonida Beconase, cetirizina Rhinocort, clorfeniramina Zyrtec, pseudoefedrina, Deconamine, Sudafed, cromolina, Nasalcrom, Intal, Opticrom, desloratadina, Clarinex, fexofenadina y pseudoefedrina, Allegra-D, fexofenadina, pulverizador nasal de flunisolida Allegra, pulverizador/inhalador nasal de propionato de fluticasona Nasalide, inhalador oral de propionato de fluticasona Flonase, Flovent, hidroxizina, Vistaril, Ataraxloratadine, pseudoefedrina, Claritin-D, loratadina, Claritin, prednisolona, Prednisolona, Pediapred líquido oral, Medrol prednisona, Deltasone, Predsalmeterol líquido, inhalador de acetona de triamcinolona Serevent, pulverizador/inhalador nasal de acetona de triamcinolona Azmacort, Nasacort o NasacortAQ. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con productos a base de dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que se han desarrollado (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando actualmente como activadores de respuestas inmunitarias innata y adquirida. Por ejemplo, la divulgación engloba el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceutical) en los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento para tratar y/o evitar trastornos alérgicos mediados por IgE (véase también Weeratna y col., 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71).

La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con cualquier anticuerpo terapéutico conocido en la técnica para el tratamiento de trastornos alérgicos, p. ej., Xolair™ (Omalizumab; Genentech); rhuMAB-E25 (BioWorld Today, Nov. 10, 1998, pág. 1; Genentech); CGP-51901 (anticuerpo anti-IgE humanizado), etc.

Adicionalmente, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con otras composiciones conocidas en la técnica para el tratamiento de trastornos alérgicos. En particular, procedimientos y composiciones divulgados en Carson y col. (documentos US 6.426.336, US 2002/0035109 A1, US 2002/0010343).

5.3.5 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

El procedimiento de la divulgación proporciona procedimientos de tratamiento para enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de los anticuerpos divulgados en el presente documento junto con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (p. ej., FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (p. ej., leflunamida), moduladores de receptor de linfocitos T y moduladores receptores de citocinas.

Los agentes antiinflamatorios han resultado exitosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios y actualmente son un tratamiento común y estándar para tales trastornos. Puede usarse cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica en los procedimientos divulgados en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozin (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmetina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (p. ej., COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

5.3.6 Agentes anticancerígenos y anticuerpos terapéuticos

En una realización específica, los procedimientos de la divulgación engloban la administración de uno o más inhibidores de la angiogénesis tales como, pero sin limitarse a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartilago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endostatina (fragmento XVIII de colágeno), fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de la heparina; H MV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10 inducible); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteinasas (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); AcMo IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa de la placenta, inhibidor del activador de plasminógeno, factor plaquetario-4 (PF4); Prinomastat; fragmento de prolactina de 16kD; proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; Solimastat, escualamina, SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahydrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; tromboespondina-1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformador beta (TGF-β); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesiltransferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerígenos que pueden utilizarse en combinación con anticuerpos divulgados en el presente documento en las diversas realizaciones de la divulgación incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, pero no se limitan a: acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina, altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlins; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimero, carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina, dacarbazina, dactinomicina, clorhidrato de daunorrubicina, decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel, doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromate; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina, fenretinida, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxuurea; clorhidrato idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón-alfa-n3, interferón beta-I a, interferón gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina, clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; metureda; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomincina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipo sulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiomicina; prednimustina; clorhidrato de procarbina; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina;

estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato, glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; uramustina; uredepa; vaporeotida; verteporfina, sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; ceniplatino; cinostatina; clorhidrato de zorrubicina. Otros fármacos anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiratenona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK, altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzolestauroporina; derivados de beta lactama; beta-alefina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilepermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de cinasas de caseína (ICOS); castanoespermene; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4, análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A, curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina, ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziacuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón, doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselene; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristeride; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos, etanidazol, fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida, flavopiridol; flecelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina ;forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabine; ganirelix, inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina, idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamine; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble hebra co apareamientos incorrectos; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafide; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a multifármacos; tratamiento a base de supresor tumoral múltiple 1; agente mostaza anticancerígeno; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilinalina; benzamidas N sustituidas; nafarelinea; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavin; nafterpin; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra, nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante nítróxico; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracin; inductor de citocinas oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactin; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato sódico de pentosán; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol de perillio; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina, pirarrubicina; piritrexima; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno, complejo de platino; compuestos de platino, complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario a base de proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tiosina fosfatasa; inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado de hemoglobina y polioxielileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de proteína farnesiltransferasa de ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogetimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcotol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina, inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína monocatenaria de unión a antígeno, sizofirán, sobuzoxano, borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1, esculamina, inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiameda; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido

5 superactivo vasoactivo intestinal; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; metiyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; 10 hormona tiroidea estimulante; etiletiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocinasa; vaporeotida; variolina B; sistema de vector, tratamiento génico con eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina, 15 vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina. Los fármacos anticancerígenos adicionales preferidos son 5-fluoroacilo y leucovorina.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en procedimientos divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que es un anticuerpo 15 monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico, REOPRO® (abciximab) (Centocor), que es un receptor anti-glucoproteína IIb/IIIa sobre las plaquetas para evitar la formación de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para evitar el rechazo agudo de aloinjerto renal; PANOREX™, que es un anticuerpo murino de IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-1A (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2, que es un anticuerpo murino de IgG antiidiotípico (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225, que es un anticuerpo quimérico de IgG anti-EGFR (ImClone System); VITAXIN™, que es un anticuerpo humanizado anti-integrina αvβ3 (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03, que es un anticuerpo de IgG1 anti-CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195, que es un anticuerpo de IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™, que es un anticuerpo de IgG1 quimérico anti-CD20 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™, que es un anticuerpo de IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ es un anticuerpo murino anti-CD20 radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (EDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNFα humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNFα humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo de IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo de IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo de IgG4 anti-TNFα humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti-α4β7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo de IgG anti-CD4 humanizado (Orto Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo de IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); 35 ANTEGREN™ es un anticuerpo de IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGFβ₂ humano (Cambridge Ab Tech).

Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos divulgados en el presente documento se presentan en la Tabla 7.

40 **Tabla 7:** Anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer que pueden usarse en combinación con los anticuerpos divulgados en el presente documento

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC
Antisoma	Theragyn (permturmorabytrium-90)	cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	bivatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	cáncer colorrectal	17-1A gp
	ReoPro	APTC infarto agudo de miocardio	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Apoplejía isquémica	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	LNH	IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar		CD20
CRC Technology	AcM, 105AD7 idiopático	vacuna contra cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM

ES 2 381 617 T3

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Cytoclonal	AcM, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón no microcítico	ND
Genentech	Herceptin	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptin	cáncer de mama en estadio temprano	HER-2
	Rituxan	LNH folicular o de grado bajo en recidiva/resistente	CD20
	Rituxan	LNH intermedio y de grado alto	CD20
	AcM-VEGF	CPNM, metastásico	VEGF
	AcM-VEGF	cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	Fab de DMS	degeneración macular senil	CD18
	E-26 (2º gen. IgE)	rinitis y asma alérgicos	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	LNH de linfocitos B, de bajo grado o folicular, en recidiva o resistente, positivo para CD-20 y LNH resistente a Rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecan	carcinoma colorrectal resistente	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	cáncer de cabeza y cuello diagnosticado recientemente o recurrente	receptor de EGF
	Cetuximab + gercitabine	carcinoma pancreático metastásico diagnosticado	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón no microcítico diagnosticado recientemente	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local/regional extensa incurable y metástasis a distancia)	
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado	receptor de EGF
	BEC2 + bacilo Calmette Guérin	carcinoma de pulmón microcítico	miméticos de gangliósido GD3
	BEC2 + bacilo Calmette Guérin	melanoma	miméticos de gangliósido GD3
	IMC-IC11	cáncer colorrectal con metástasis hepática	receptor de VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM I	cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	linfoma no hodgkiniano	CD22
	LymphoCide Y-90	linfoma no hodgkiniano	CD22
	CEA-Cide	metástasis de tumores sólidos	CEA
	CEA-Cide Y-90	metástasis de tumores sólidos	CEA

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de mama (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (radioimagen)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección de tejidos blandos (radioimagen)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfomas (radiomagen)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres hepáticos de células 7 gem (radioimagen)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	ND
Medarex	HumaSPECT MDX-101 (CTLA-4)	imagen colorrectal cánceres de próstata y otros cánceres	ND CTLA-4
MedImmune	MDX-210 (sobrexpresión de MDX-210/MAK) Vitaxina	cáncer de próstata cáncer cáncer	HER-2 HER-2 αvβ ₃
Merck KGaA	AcM 425 IS-IL-2	cánceres diversos cánceres diversos	receptor de EGF Ep-CAM
Millennium	Campath (alemuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90) Avidicina (albúmina + NRLU13)	linfoma no hodgkiniano cáncer metastásico	CD20 ND
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131) Cotara (+ yodo-131)	linfoma no hodgkiniano glioma maligno no extirpable	HLA-DR 10 beta Proteínas asociadas a ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica) AcM, cáncer de pulmón/riñón nacolomab tafenatox	cáncer de páncreas cáncer de pulmón y riñón	ND ND
	(C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer de colon y pancreático	ND
Protein Design Labs	Nuvion SMART M195 SMART ID10	Neoplasias malignas de linfocitos T LMA LNH	CD3 CD33 antígeno HLA-DR

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoAcM-G2 radiomarcado	linfoma no hodgkiniano	ND
	Monopharm C	carcinoma colorrectal y pancreático	antígeno SK-1
	GlioAcM-H (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma y neuroblastoma	ND
Xoma	Rituxan	LNH folicular o de grado bajo en recidiva/resistente	CD20
	Rituxan	LNH intermedio y de grado alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

5.3.7 Tratamiento con vacuna

La divulgación proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria frente a una composición de vacuna en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho sujeto un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen específicamente Fc γ RIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen Fc γ RIIA, y una composición de vacuna, en la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos potencian la respuesta inmunitaria frente a dicha composición de vacuna. En una realización concreta, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos potencian la respuesta inmunitaria frente a dicha composición de vacuna potenciando la presentación de antígeno y/o el procesamiento de antígeno del antígeno al que se dirige la vacuna. Cualquier composición de vacuna conocida en la técnica es útil en combinación con los anticuerpos o sus fragmentos como se divulga en el presente documento.

En una realización, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con cualquier vacuna contra el cáncer conocida en la técnica, p. ej., CanvaxinTM (Cancer Vax, Corporation, melanoma y cáncer de colon); Oncophage (HSPPC-96; Antigenics; melanoma metastásico); vacuna contra el cáncer de HER-2/neu, etc. Las vacunas contra el cáncer usadas en los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, vacunas específica de antígeno, vacunas antiidiotípicas, vacunas de células dendríticas o vacunas de ADN. La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento con vacunas a base de células como se describen por Segal y col. (documento US 6.403.080). Las vacunas a base de células usadas en combinación con los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ser autólogas o alogénicas. Brevemente, las vacunas basadas en cáncer como se describen por Segal y col. están basadas en el producto Opsonokine (TM) por Genitrix, LLC. Las Opsonokines (TM) son citocinas manipuladas genéticamente que, cuando se mezclan con células tumorales, se unen automáticamente a la superficie de las células. Cuando las células "decoradas" se administran como una vacuna, la citocina de las células activa las células presentadoras de antígeno del receptor, permitiendo al mismo tiempo que las células presentadoras de antígeno ingieran las células tumorales. Las células presentadoras de antígeno son entonces capaces de instruir a los linfocitos T citotóxicos para que encuentren y destruyan células tumorales similares en todo el organismo. Por tanto, el producto Opsonokine (TM) convierte las células tumorales en un agente inmunoterapéutico antitumoral potente.

En una realización, la divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento en combinación con cualquier vacuna para la alergia conocida en la técnica. Los anticuerpos, pueden usarse, por ejemplo, en combinación con moléculas híbridas recombinantes que codifican los alérgenos principales del polen de la hierba timotea usados para la vacunación contra la alergia al polen de hierba, como se describe por Linhart y col. (2000, FASEB Journal, 16(10):1301-3). Además, los anticuerpos pueden usarse en combinación con vacunas a base de ADN descritas por Horner y col. (2002, Allergy, 57 Supl, 72:24-9). Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con vacunación con el bacilo de Calmette-Guérin ("BCG") como se describe por Choi y col. (2002, Ann. Allergy Asthma Immunology, 88(6): 584-91) y Barlan y col. (2002, Journal Asthma, 9(3):239-46) para regular por disminución la secreción de IgE. Los anticuerpos divulgados en el presente documento son útiles para tratar alergias alimentarias. En particular, los anticuerpos pueden usarse en combinación con vacunas u otros

inmunotratamientos conocidos en la técnica (véase Hourihane y col., 2002, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(3):227-31) para el tratamiento de alergias al cacahuete.

Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con vacunas, en las que se desea inmunidad frente al/a los antígeno(s). Tales antígenos pueden ser cualquier antígeno conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden usarse para potenciar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, frente a agentes infecciosos, células enfermas o anormales, tales como, pero sin limitarse a, bacterias (p. ej., bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, bacterias aerobias, espiroquetas, micobacterias, rickettsias, clamidias, etc.), parásitos, hongos (p. ej., *Candida albicans*, *Aspergillus*, etc.), virus (p. ej., virus de ADN, virus de ARN, etc.) o tumores. Las infecciones víricas incluyen, pero no se limitan a, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D u otros virus de hepatitis; citomegalovirus, virus herpes simplex-1 (-2, 3 -4, -5, -6), papilomavirus humanos, virus respiratorio sincitial (VRS), virus paragrupal (VPG), virus de Epstein Barr o cualquier otra infección vírica.

La divulgación engloba el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento para potenciar una respuesta humoral y/o mediada por células frente al/a los antígeno(s) de la composición de vacuna. La divulgación engloba adicionalmente el uso de los anticuerpos divulgados en el presente documento para evitar o tratar un trastorno concreto, en el que una respuesta inmunitaria frente a un antígeno o antígenos concretos es eficaz para tratar o evitar la enfermedad o trastorno. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, infecciones víricas, tales como VIH, CMV, hepatitis, herpes virus, sarampión, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y parasitarias, cánceres y cualquier otra enfermedad o trastorno susceptibles de ser tratados o evitados potenciando una respuesta inmunitaria frente a un antígeno o antígenos concretos.

5.4 Composiciones y procedimientos de administración

La divulgación proporciona procedimientos y composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos divulgados en el presente documento. La divulgación proporciona también procedimientos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, administrando a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada divulgadas en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o moléculas conjugadas divulgadas en el presente documento. En un aspecto preferido, un anticuerpo o proteína de fusión o molécula conjugada, está sustancialmente purificada (es decir, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (p. ej., monos, tales como, un macaco de Java y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Se conocen y pueden usarse diversos sistemas de administración para administrar una composición que comprende anticuerpos divulgados en el presente documento p. ej., encapsulación en liposomas, microparticulas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

En algunas realizaciones, los anticuerpos divulgados en el presente documento se formulan en liposomas para la administración dirigida de los anticuerpos. Los liposomas son vesículas que constan de bicapas de fosfolípidos ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. Los liposomas comprenden normalmente diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos. Los componentes de los liposomas se disponen en una configuración de bicapa, similar a la organización de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas son vehículos de administración especialmente preferidos, debido, en parte, a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y baja toxicidad. Los procedimientos para la preparación de liposomas son conocidos en la técnica y se engloban dentro de la divulgación véanse, p. ej., Epstein y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang y col., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; las patentes de EE. UU. N.º 4.485.045 y 4.544.545.

La divulgación también engloba procedimientos de preparación de liposomas con una semivida en suero prolongada, es decir, un tiempo de circulación potenciado, tales como los divulgados en la patente de EE. UU. N.º 5.013.556. Los liposomas preferidos usados en los procedimientos divulgados en el presente documento no se eliminan rápidamente de la circulación, es decir, no se incorporan en el sistema fagocítico mononuclear (SFM). La divulgación engloba liposomas estabilizados estéricamente que se preparan usando procedimientos comunes conocidos por el experto en la técnica. Aunque sin pretender quedar ligados a un mecanismo de acción concreto, los liposomas estabilizados estéricamente contienen componentes lipídicos con restos hidrófilos voluminosos y altamente flexibles, lo que reduce la reacción no deseada de los liposomas con proteínas séricas, reduce la opsonización con componentes séricos y reduce el reconocimiento por el SFM. Los liposomas estabilizados estéricamente se preparan, preferentemente, usando polietilenglicol. Para la preparación de liposomas y liposomas estabilizados estéricamente véanse, p. ej., Bendas y col., 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224; Allen y col., 1987, FEBS Lett. 223: 42-6; Klibanov y col., 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum y col., 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7; Torchilin y col., 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116; Litzinger y col., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama y col., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klibanov y col., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062: 142-8; Allen y col., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309. La divulgación también engloba liposomas que están adaptados para dirigirse a órganos

específicos, véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.544.545. Pueden generarse liposomas especialmente útiles para su uso en las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento mediante un procedimiento de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. En algunas realizaciones, puede conjugarse un fragmento de un anticuerpo divulgado en el presente documento, p. ej., F(ab'), con los liposomas usando procedimientos divulgados anteriormente, véase, p. ej., Martin y col., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los inmunoliposomas se refieren a una composición liposómica, en la que un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos está enlazado, covalentemente o no covalentemente, a la superficie de los liposomas. La química de enlazar un anticuerpo a la superficie del liposoma es conocida en la técnica y se engloba dentro de la invención, véase, p. ej., Allen y col., 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen y col., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-44. En las realizaciones más preferidas, los inmunoliposomas para su uso en los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento se estabilizan estéricamente adicionalmente. Preferentemente, los anticuerpos divulgados en el presente documento están unidos covalentemente o no covalentemente a un anclaje hidrófobo, que está insertado de forma estable en la bicapa lipídica del liposoma. Los ejemplos de anclajes hidrófobos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, p. ej., fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI). Para lograr un enlace covalente entre un anticuerpo y un anclaje hidrófobo, puede usarse cualquiera de las estrategias bioquímicas conocidas en la técnica, véase, p. ej., J. Thomas August, ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, volumen 40, Academic Press, San Diego, CA., págs. 399-435. Por ejemplo, un grupo funcional de una molécula de anticuerpo pueden reaccionar con un grupo activo de un anclaje hidrófobo asociado con un liposoma, p. ej., un grupo amino de una cadena lateral de lisina de un anticuerpo puede acoplarse con N-glutaril-fosfatidiletanolamina activada con carbodiimida soluble en agua asociado a un liposoma; o un grupo tiol de un anticuerpo reducido puede acoplarse con liposomas a través de anclajes que reaccionan con tiol tales como piridiltiopropionil-fosfatidiletanolamina. Véanse, p. ej., Dietrich y col., 1996, *Biochemistry*, 35: 1100-1105; Loughrey y col., 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 901: 157-160; Martin y col., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288; Martin y col., 1981, *Biochemistry*, 20: 4429-38.

Aunque sin pretender quedar ligado a un mecanismo de acción concreto, las formulaciones de inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo divulgado en el presente documento son especialmente eficaces como agentes terapéuticos, ya que administran el anticuerpo al citoplasma de la célula diana, es decir, la célula que comprende el receptor de FcγRIIB al que se une el anticuerpo. Preferentemente, los inmunoliposomas tienen una semivida en sangre incrementada, se dirigen específicamente a las células y pueden internalizarse en el citoplasma de las células diana, evitando de este modo la pérdida de agente terapéutico o la degradación a través de la ruta endolisosómica.

La divulgación engloba inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos. En algunas realizaciones, los inmunoliposomas comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los divulgados en el presente documento.

Las composiciones de inmunoliposomas divulgadas en el presente documento comprenden uno o más lípidos formadores de vesículas, un anticuerpo divulgado en el presente documento o uno de sus fragmentos o derivados y, opcionalmente, un polímero hidrófilo. Un lípido formador de vesículas es, preferentemente, un lípido con dos cadenas hidrocarbonadas, tales como cadenas aciladas, y un grupo de cabeza polar. Los ejemplos de lípidos formadores de vesículas incluyen fosfolípidos, p. ej., fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, esfingomielina y glucolípidos, p. ej., cerebrosidos, gangliósidos. Los lípidos adicionales útiles en las formulaciones divulgadas en el presente documento son conocidos por el experto en la técnica y se engloban dentro de la divulgación. En algunas realizaciones, las composiciones de inmunoliposomas comprenden además un polímero hidrófilo, p. ej., polietilenglicol y gangliósido GM1, que incrementa la semivida en suero del liposoma. Los procedimientos de conjugación de polímeros hidrófilos con liposomas son bien conocidos en la técnica y se engloban en el presente documento. Para una revisión de inmunoliposomas y procedimientos para prepararlos, véanse, p. ej., la publicación internacional PCT N.º WO 97/38731, Vingerhoeads y col., 1994, *Immunomethods* 4: 259-72; Maruyama, 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23(7): 791-799; Abra y col., 2002, *Journal of Liposome Research*, 12(1&2): 1-3; Park, 2002, *Bioscience Reports*, 22(2):267-281; Bendas y col., 2001 *BioDrugs*, 14(4): 215-224; J. Thomas August, ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, volumen 40, Academic Press, San Diego, CA., págs. 399-435.

Los procedimientos de administración de un anticuerpo divulgado en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (p. ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (p. ej., vías intranasal y oral). En una realización específica, los anticuerpos divulgados en el presente documento se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede emplearse también la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y la formulación con un agente en aerosol. Véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT N.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/166903.

La divulgación también dispone que los anticuerpos divulgados en el presente documento se envasan en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, los anticuerpos se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente y pueden reconstituirse, p. ej., con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferentemente, los anticuerpos se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente cerrado herméticamente a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente de al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Los anticuerpos liofilizados deben conservarse a entre 2 y 8 °C en su recipiente original y los anticuerpos deben administrarse en un plazo de 12 horas, preferentemente en un plazo de 6 horas, en un plazo de 5 horas, en un plazo de 3 horas o en un plazo de 1 hora después de reconstituirlos. En una realización alternativa, los anticuerpos se suministran en forma líquida en un recipiente cerrado herméticamente que indica la cantidad y concentración del anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los anticuerpos se suministra en un recipiente cerrado herméticamente con al menos 1 mg/ml, más preferentemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, a menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos de 200 mg/ml de los anticuerpos.

La cantidad de la composición divulgada en el presente documento que será eficaz para tratar, evitar o mejorar uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis exacta que se ha de emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la afección, y debería decidirse de acuerdo con la opinión del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Para anticuerpos que se engloban en el presente documento, la dosis administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg de peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida dentro del organismo humano más prolongada que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos exógenos. Por tanto, dosificaciones menores de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente son a menudo posibles. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de anticuerpos divulgados en el presente documento o sus fragmentos pueden reducirse potenciado la incorporación y la penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

En una realización, la dosificación de los anticuerpos divulgados en el presente documento administrada a un paciente es de 0,01mg a 1000 mg/día, cuando se usan como agente terapéutico único. En otra realización, los anticuerpos divulgados en el presente documento se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es más baja que cuando dichos anticuerpos se usan como agente terapéutico único.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas o fibras. Preferentemente, al administrar un anticuerpo divulgado en el presente documento, debe tomarse la precaución de usar materiales a los que no se absorban el anticuerpo o la proteína de fusión.

En otra realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat y col., en *Liposomes in the Therapy os Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (ed.), Liss, Nueva York, pág. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibidem.*, pág. 3 17-327; véase en general, *ibidem*).

En otra realización más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o mantenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación mantenida que comprenden uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento. Véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning y col., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song y col., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek y col., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam y col., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759.760. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald y col., 1980, *Surgery* 88:507; y Saudek y col., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr una liberación controlada de los anticuerpos (véanse, p. ej., *Medical Application of Controlled Release*, Langer y Wise (ed.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability*,

Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (ed.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véanse también Levy y col., 1985, Science 228:190; During y col., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y col., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); la patente de EE. UU. N.º 5.679.377; la patente de EE. UU. N.º 5.916.597; la patente de EE. UU. N.º 5.912.015, la patente de EE. UU. N.º 5.989.463, la patente de EE. UU. N.º 5.128.326; la publicación PCT N.º WO 99/15154; y la publicación PCT N.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación mantenida incluyen, pero no se limitan a, poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etileno-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otra realización más, puede situarse un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica (p. ej., los pulmones), requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan de acuerdo con Dunn y col. (véase el documento U.S. 5.945.155). Este procedimiento concreto se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo desde el sistema de polímero. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte del organismo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de administración mantenida no polimérico, para el que se usa un implante no polimérico en el organismo del sujeto como un sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el organismo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o se filtrará desde la composición en los fluidos de tejidos circundantes y el material no polimérico coagulará o precipitará de forma gradual para formar una matriz microporosa sólida (véase el documento U.S. 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión por Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación mantenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos divulgados en el presente documento. Véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 4.526.938; las publicaciones internacionales N.º WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning y col., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song y col., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek y col., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; y Lam y col., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una realización específica en la que la composición divulgada en el presente documento es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y administrándolo de forma que se haga intracelular, p. ej., mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de EE. UU. N.º 4.980.286), o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont) o recubriéndolo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, administrándolo enlazado a un péptido de tipo homeosecuencia que se sabe que entra en el núcleo (véase, p. ej., Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

Para anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es, normalmente, de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. Preferentemente, la dosificación administrada a un sujeto es de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del sujeto y, más preferentemente, la dosificación administrada a un sujeto es de entre 1 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal del sujeto. La dosificación y la frecuencia de administración de anticuerpos divulgados en el presente documento pueden reducirse también potenciando la incorporación y la penetración en los tejidos (p. ej., en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de anticuerpos divulgados en el presente documento puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con anticuerpos en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante un periodo de entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez por semana, dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. Asimismo, se apreciará que la dosificación eficaz de los anticuerpos usados para el tratamiento puede incrementarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento concreto.

5.4.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones divulgadas en el presente documento incluyen composiciones de principio activo útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgado en el presente documento o una combinación de esos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones divulgadas en el presente documento comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de anticuerpos divulgados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización concreta, la composición farmacéutica consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o uno de sus fragmentos que unen FcyRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos unen FcyRIIA, un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno canceroso y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dicha composición farmacéutica comprende además uno o más agentes anticancerígenos.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de EE. UU. o recogido en la farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (p. ej., adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los derivados del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse también como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades secundarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación mantenida y similares.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones divulgadas en el presente documento se proporcionan bien por separado o bien mezclados juntos en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición ha de administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las que se forman con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las que se forman con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5.4.2 Tratamiento génico

En una realización específica, se administran secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o proteínas de fusión para tratar, evitar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, a modo de tratamiento génico. El tratamiento génico se refiere al tratamiento realizado mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresable o expresado. En esta realización, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificados que median un efecto terapéutico o profiláctico.

Puede usarse cualquiera de los procedimientos para el tratamiento génico disponibles en la técnica de acuerdo con la divulgación. Los procedimientos ejemplares se describen a continuación.

Para revisiones generales de los procedimientos de tratamiento génico, véanse Goldspiel y col., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; mayo de 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Los procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y col. (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegl, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

En un aspecto preferido, una composición divulgada en el presente documento comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en

un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos de manera operable a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización concreta, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualquier otra región codificante están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, permitiendo así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra y col., 1989, Nature 342:435-438).

En otro aspecto preferido, una composición divulgada en el presente documento comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos de manera operable a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización concreta, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, permitiendo así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión.

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

En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y administrándolos de forma que se hagan intracelulares, p. ej., por infección usando vectores retrovíricos defectivos o atenuados u otros vectores víricos (véase la patente de EE. UU. N.º 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont) o por recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolos enlazados a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolos enlazados a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que puede usarse para dirigirse a tipos celulares que expresan los receptores específicamente), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para alterar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específica de célula, dirigiéndolo a un receptor específico (véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/06180, WO 92/22635, W092/20316, W093/14188, WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para su expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra y col., 1989, Nature 342:435-438).

En una realización específica, se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión. Por ejemplo, puede usarse un vector retrovírico (véase Miller y col., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se van a usar en el tratamiento génico se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Pueden encontrarse más detalles acerca de los vectores retrovíricos en Boesen y col., (1994, Biotherapy 6:291-302), que describen el uso de un vector retrovírico para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en el tratamiento génico son: Clowes y col., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein y col., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden usarse en el tratamiento génico. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios, donde provocan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración a base de adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson (Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993, presentan una revisión del tratamiento génico a base de adenovirus. Bout y col., (Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994) demostraron el uso de vectores adenovíricos para transferir genes a los epitelios respiratorios de macacos rhesus. Pueden encontrarse otros casos del uso de adenovirus en tratamiento génico en Rosenfeld y col., 1991, Science 252:431-434; en Rosenfeld y col., 1992, Cell 68:143-155; en Mastrangeli y col., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; en la publicación PCT W094/12649; y en Wang y col., 1995, Gene Therapy 2:775-783. En una realización preferida se usan vectores adenovíricos.

También se ha propuesto el uso de virus adenoasociados (AAV) en tratamiento génico (véanse, p. ej., Walsh y col., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med 204:289-300 y la patente de EE. UU. N.º 5.436.146).

Otro enfoque para el tratamiento génico implica la transferencia de un gen a células en cultivo tisular mediante procedimientos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Habitualmente, el procedimiento de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se someten a selección para aislar las células que han incorporado y expresan el gen transferido. Esas células se administran después a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción pueden llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o de bacteriófago que contenga las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosas técnicas en la técnica para la introducción de genes exógenos en células (véanse, p. ej., Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618, Cohen y col., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; y Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985) y pueden usarse de acuerdo con la divulgación, con la condición de que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debería permitir la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de forma que el ácido nucleico sea expresable por la célula y, preferentemente, sea heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (p. ej., células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran, preferentemente, por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede determinarse por un experto en la técnica.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de tratamiento génico engloban cualquier tipo de célula disponible deseado e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, p. ej., como las obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para tratamiento génico es autóloga del sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en tratamiento génico, se introducen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión en las células, de forma que sean expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran después *in vivo* para el efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. De acuerdo con esta realización de la divulgación, puede usarse potencialmente cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (véanse, p.ej, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 7 1:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61: 771).

En una realización específica, el ácido nucleico que se va a introducir con fines de tratamiento génico comprende un promotor inducible unido de forma operable a la región codificante, de forma que la expresión del ácido nucleico puede controlarse controlando la presencia o ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

5.4.3 Kits

La divulgación proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con los anticuerpos divulgados en el presente documento. Adicionalmente, pueden incluirse también uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad en el envase o kit farmacéutico. La divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento. Opcionalmente, asociado con tal(es) recipiente(s) puede existir un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental de EE. UU. que regula la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración en seres humanos.

La presente divulgación proporciona kits que pueden usarse en los procedimientos anteriores. En una realización, un kit comprende uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento. En otra realización, el kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que unen uno o más antígenos cancerosos asociados con el cáncer. En algunas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.5 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas o agentes profilácticos o terapéuticos divulgados en el presente documento se ensayan, preferentemente, *in vitro*, p. ej., en un sistema de cultivo celular, y después *in vivo*, p. ej., en un organismo animal modelo, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para evaluar la actividad terapéutica

- deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica está indicada, incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido de un paciente se crece en cultivo y se expone a o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido, p. ej., la inhibición de o la disminución en el crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en preparación de matriz extracelular o membrana basal tridimensional. La muestra de tejido puede obtenerse mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profilácticamente o terapéuticamente más eficaz para cada paciente individual. De forma alternativa, en lugar de cultivar células de un paciente, pueden analizarse los procedimientos y agentes terapéuticos usando células de una línea celular tumoral o maligna. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria (p. ej., linfocitos T) para determinar si una composición farmacéutica divulgada en el presente documento tiene un efecto deseado sobre tales tipos celulares. Pueden usarse muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento de células directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (p. ej., fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul de tripano, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular, etc.
- Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden ensayarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En una realización específica, se ensayan combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Tales sistemas de modelo se usan ampliamente y son bien conocidos por el experto. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar, tales como el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si tales agentes se administran por separado o como una mezcla.
- Los modelos animales preferidos para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcyR sobre células efectoras de ratón, p. ej., cualquier modelo de ratón descrito en la patente de EE. UU. N.º 5.877.396. Los ratones transgénicos para su uso en el procedimiento divulgado en el presente documento incluyen, pero no se limita a, ratones portadores de FcyRIIA humano, ratones portadores de FcyRIIA humano, ratones portadores de FcyRIIB humano y FcyRIIA humano, ratones portadores de FcyRIIB y FcyRIIA humano.
- Una vez que se han ensayado los agentes profilácticos y/o terapéuticos divulgados en el presente documento en un modelo animal, pueden probarse en ensayos clínicos para determinar su eficacia. El establecimiento de ensayos clínicos se realizará de acuerdo con las metodologías comunes conocidas por un experto en la técnica y las dosificaciones óptimas y las vías de administración, así como los perfiles de toxicidad de las composiciones divulgadas en el presente documento, pueden determinarse usando experimentación de rutina.
- La actividad antiinflamatoria de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento puede determinarse usando diversos modelos experimentales animales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty y col. (ed.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Los modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias también pueden usarse para evaluar la actividad antiinflamatoria de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento. A continuación se proporcionan algunos ensayos como ejemplos, y no a modo de limitación.
- Los principales modelos animales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados son: modelos de rata de artritis inducida por adyuvantes, modelos de ratón y rata de artritis inducida por colágeno y modelos de hámster, conejo y rata de artritis inducida por antígeno, todos ellos descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty y col.(ed.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).
- La actividad antiinflamatoria de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenina. La artritis inducida por carragenina también se ha usado en conejo, perro y cerdo en estudios de inflamación o artritis crónica. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se usa para determinar la eficacia terapéutica. Los procedimientos para usar un modelo tal de artritis inducida por carragenina se describen en Hansra P. y col., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por cimosano, como se conoce y se describe en la técnica.
- La actividad antiinflamatoria de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento también puede evaluarse midiendo la inhibición del edema en la pata inducido por carragenina en la rata, usando una modificación del procedimiento descrito en Winter C. A. y col., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay

for And-inflammatory Drugs" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 44-547, (1962). Este ensayo se ha usado como un análisis primario *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE y se considera predictivo para la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos ensayados se expresa como el porcentaje de inhibición del incremento del peso de la pata trasera del grupo de ensayo en relación con el grupo de control al que se le suministra vehículo.

Adicionalmente, también pueden usarse modelos animales para enfermedad inflamatoria intestinal para evaluar la eficacia de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento (Kim y col., 1992, Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober, 1985, Dig. Dis. Sci. 30 (12 Supl):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias intestinales que pueden inducirse en animales. Pueden administrarse polisacáridos sulfatados, incluyendo, pero sin limitarse a, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos incluyendo, pero sin limitarse a, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético a animales por vía oral para inducir enfermedades intestinales inflamatorias.

Los modelos animales para el asma también pueden usarse para evaluar la eficacia de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento. Un ejemplo de un modelo de ese tipo es el modelo de transferencia adoptiva murino en el que la provocación por aeroalérgenos de los TH1 y TH2 del ratón receptor da como resultado la migración de células efectoras TH a las vías respiratorias y se asocia con una respuesta intensa neutrofílica (TH1) y eosinofílica (TH2) inflamatoria de la mucosa pulmonar (Cohn y col., 1997, J. Exp. Med. 186:1737-1747).

Los modelos animales para trastornos autoinmunitarios también pueden usarse para evaluar la eficacia de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders y col., 1999, Autoimmunity 29:235-246; Krogh y col., 1999, Biochimie 81:511-515; Foster, 1999, Semin. Nephrol. 19:12-24).

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos divulgados en el presente documento puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, p. ej., para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz para el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestran efectos secundarios tóxicos, debería tomarse la precaución de diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado, con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el procedimiento divulgado en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración de circulación en plasma que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración de compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

La actividad anticancerígena de los tratamientos usados de acuerdo con la presente divulgación puede determinarse también usando diversos modelos animales de experimentación para el estudio del cáncer, tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones atímicos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsters, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, ed. Fiebig y Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, ed. Boven y Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher).

Los protocolos y composiciones divulgados en el presente documento se ensayan, preferentemente, *in vitro* y después *in vivo*, para evaluar la actividad profiláctica o terapéutica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes terapéuticos y procedimientos pueden analizarse usando células de una línea celular tumoral o maligna. Pueden usarse muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento de células directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (p. ej., fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul de tripano, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento

y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular, etc.

5 Los compuestos para su uso en tratamiento pueden ensayarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de ensayarlos en seres humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsters, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos pueden usarse después en los ensayos clínicos adecuados.

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de los tratamientos combinados divulgados en el presente documento para tratar o evitar el cáncer, trastornos inflamatorios o enfermedades autoinmunitarias.

10 **5.6 Procedimientos de diagnóstico**

Los anticuerpos marcados divulgados en el presente documento pueden usarse para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades, trastornos o infecciones. La divulgación permite la detección o diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección, en particular una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo: a) ensayar la expresión de FcγRIIB en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a FcγRIIB; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, p. ej., niveles en muestras de tejido normal, mediante el que un incremento en el nivel ensayado de antígeno comparado con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección.

20 Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse para ensayar los niveles de FcγRIIB en una muestra biológica usando procedimientos inmunohistológicos clásicos, como se describe en el presente documento o como se conoce por los expertos en la técnica (p. ej., véanse Jalkanen y col., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen y col., 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096). Otros procedimientos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores de ensayo para anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo (¹²⁵I, ¹³¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹²¹In) y tecnecio (^{99m}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

30 Un aspecto de la divulgación es la detección y diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección en un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado que se une inmunoespecíficamente a FcγRIIB; b) dejar pasar un intervalo de tiempo después la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios del sujeto en los que se expresa FcγRIIB (y para que las moléculas marcadas no unidas se eliminen hasta llegar al nivel de base); c) determinar el nivel de base; y d) detectar el anticuerpo marcados en el sujeto, de modo que la detección del anticuerpo marcado por encima del nivel de base indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno o infección. De acuerdo con esta realización, el anticuerpo se marca con un resto de formación de imágenes, que es detectable usando un sistema de formación de imágenes conocido para el experto en la técnica. El nivel de base puede determinarse mediante diversos procedimientos incluyendo la comparación de la cantidad de molécula marcada detectada con un valor determinado anteriormente para un sistema concreto.

40 Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinarán la cantidad de resto de formación de imágenes necesario para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada varía normalmente desde aproximadamente 5 hasta 20 milicurios de ^{99m}Tc. Después, el anticuerpo marcado se acumulará preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. La formación de imágenes tumorales *in vivo* se describe en S.W. Burchiel y col., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments". (capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, ed., Masson Publishing Inc. (1982).

50 Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo posterior a la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios del sujeto y para que la molécula marcada no unida se elimine hasta el nivel de base, es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo posterior a la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En una realización, se lleva a cabo la monitorización de una enfermedad, trastorno o infección se lleva a cabo repitiendo el procedimiento para diagnosticar la enfermedad, trastorno o infección, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

55 La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando procedimientos conocidos en la técnica para análisis *in vivo*. Estos procedimientos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar el procedimiento adecuado para detectar un marcador concreto. Los procedimientos y dispositivos que pueden usarse en los procedimientos de diagnóstico de la invención incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (TC), escáner de cuerpo entero tal como tomografía por emisión de positrones (TEP),

formación de imágenes por resonancia magnética (RM) y sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico que responde a la radiación (Thurston y col., en la patente de EE. UU. N.º 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de análisis que responde a la fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal que emite positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando formación de imágenes por resonancia magnética (RM).

6. EJEMPLOS

6.1 Preparación de anticuerpos monoclonales

Se produjo un anticuerpo monoclonal de ratón a partir de los clones 3H7 o 2B6 con números de acceso de ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Se generó un anticuerpo monoclonal de ratón que une específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo monoclonal une FcγRIIA. Se inmunizaron ratones transgénicos para FcγRIIA (generados en el laboratorio del Dr. Ravetch, de la Universidad Rockefeller) con FcγRIIB purificado a partir del sobrenadante de células 293 que se habían transfectado con ADNc que codifica los residuos 1-180 del dominio extracelular del receptor FcγRIIB humano. Se produjeron y reastrearon líneas celulares de hibridoma a partir de células del bazo de estos ratones para localizar anticuerpos que unen específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que los anticuerpos unen FcγRIIA.

6.2 Análisis y caracterización de anticuerpos

20 Materiales y procedimientos

Se analiza la inmunorreactividad de sobrenadantes de cultivos de hibridoma frente a FcγRIIA o FcγRIIB usando ensayos ELISA. En cada caso, la placa se recubre con 100 ng/pocillo de FcγRIIA o FcγRIIB. La unión del anticuerpo al receptor específico se detecta con anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra monitorizando la absorbancia a 650 nm.

En el experimento ELISA de bloqueo se monitoriza la capacidad del anticuerpo del sobrenadante del hibridoma para bloquear la unión de IgG agregada a FcγRIIB. La placa se bloquea con el "agente bloqueante" apropiado, se lava tres veces (200 μl/pocillo) con tampón de lavado (PBS más Tween al 0,1 %). La placa se preincuba con sobrenadante de hibridoma durante 1 hora a 37 °C. Después del bloqueo, se añade a los pocillos una cantidad fija de IgG humana biotilada agregada (1 μg/pocillo), para permitir que el agregado se una al receptor FcγRIIB. Esta reacción se lleva a cabo durante dos horas a 37 °C. Después se monitoriza la detección, tras el lavado adicional con conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano picante, que detecta la IgG agregada unida. La absorbancia a 650 nm es proporcional a la IgG agregada unida.

En un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa se monitoriza la capacidad de un anticuerpo del sobrenadante del hibridoma para inhibir la liberación de β-hexosaminidasa inducida por Fcε. Se transfectan células RBL-2H3 con FcγRIIB humano; las células se estimulan con diversas concentraciones de fragmento F(ab)₂ anti-ratón de cabra que varían desde 0,03 μg/ml hasta 30 μg/ml; se sensibilizan, bien con IgE de ratón sola (a 0,01 μg/ml) o bien con un anticuerpo anti-FcγRIIB. Tras 1 hora de incubación, las células se precipitan por centrifugación; se recoge el sobrenadante; y se lisan las células. La actividad β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante se determina en un ensayo colorimétrico usando p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamínido. La actividad β-hexosaminidasa liberada se expresa como un porcentaje de la actividad liberada con relación a la actividad total.

Análisis de FACS

Se tiñen células CHO que expresan FcγRIIB con diversos anticuerpos y se analizan mediante FACS. En una serie de experimentos, las células se marcan directamente para determinar si los anticuerpos monoclonales reconocen el receptor.

En el experimento FACS de bloqueo se monitoriza la capacidad del anticuerpo del sobrenadante del hibridoma para bloquear la unión de IgG agregada a FcγRIIB. Se incuban aproximadamente 1 millón de células (células CHO que expresan FcγRIIB) para cada muestra en hielo durante 30 minutos con 2 μg del control de isotipo (IgG1 de ratón) o con el anticuerpo de 2B6 o 3H7. Las células se lavan una vez con PBS+BSA al 1 % y se incuban con 1 μg de IgG humana biotilada agregada durante 30 minutos en hielo. Se lavan las células y se añaden los anticuerpos secundarios, anti-ratón-FITC de cabra para detectar el anticuerpo unido y conjugado de estreptavidina-PE para detectar IgG humana biotilada agregada unida y se incuban en hielo durante 30 minutos. Las células se lavan y se analizan mediante FACS.

Los linfocitos B se tiñen para detectar la presencia de FcγRIIB y CD20. 200 μl de "capa leucocítica" para cada muestra se incuban en hielo con 2 μg de control de isotipo o los anticuerpos monoclonales, 2B6 o 3H7. Las células se lavan una vez con PBS+BSA al 1 % y se incuban con 1 μl de anticuerpo anti-ratón-PE de cabra durante 30 minutos en

hielo. Las células se lavan una vez y se añade anticuerpo CD20-FITC (2 µg) a las muestras y se incuban en hielo durante 30 minutos. Todas las muestras se lavan con PBS+BSA al 1 % una vez y después las células se analizan mediante FACS.

Ensayo de ADCC

5 Se marcan $4-5 \times 10^6$ células diana que expresan el antígeno Her2/neu (IGROV-1 o SKBR-3) con bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridin-t-6"-dicarboxilato (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Se añade reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37 °C preferentemente bajo CO₂ al 5 %, durante al menos 30 minutos. Después, las células se lavan con un tampón fisiológico, p. ej., PBS con sulfipirazol 0,125 mM, y medios que
10 contienen sulfipirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas se añaden a células efectoras, p. ej., PBMC, para producir proporciones efector:diana de aproximadamente 50:1, 75:1 o 100:1. Las PBMC se aíslan separando en capas sangre completa sobre Ficoll-Hypaque (Sigma) y centrifugando a temperatura ambiente durante 30 minutos a 500 g. La capa leucocítica se recoge como efectores para ensayos de ADCC basado en europio. Monocitos elutriados congelados o recién aislados (Advanced Biotechnologies, MD) se usan como efectores con las líneas celulares tumorales a proporciones variables de efector y diana de 100:1 a 10:1 y la concentración de los anticuerpos se valora desde 1-15 µg/ml. En ensayos de ADCC se usan como células efectoras monocitos obtenidos como reservas congeladas estimulados con citocinas. Si los monocitos congelados tienen un comportamiento óptimo, se usarán de forma rutinaria, en caso contrario, se usarán células recién obtenidas. Los MDM se prepararán mediante el tratamiento con citocinas GM-CSF o M-CSF que se sabe que potencian la viabilidad y la diferenciación de monocitos en cultivo. Los MDM se estimularán con citocinas y la expresión de los diversos FcγR (I, IIA, IIB y IIIA) se determinará mediante análisis FACS.
20

Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, y hasta 16 horas, a 37 °C, bajo CO₂ al 5 % en presencia de un anticuerpo antitumoral, específico para un antígeno expresado sobre las células diana, Her2/neu, y en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-FcγRIIB. Se usa como control negativo un anticuerpo 4D5 quimérico que se ha manipulado para que contenga la mutación N297A, ya que este anticuerpo une las células diana del tumor a través de su región variable. La pérdida de glucosilación en este sitio anula la unión de la región Fc del anticuerpo a FcγR. La IgG1/k humana comercialmente disponible sirve como control de isotipo para el anticuerpo anti-FcγRIIB. Los sobrenadantes de células se recogen y se añaden a una solución ácida de europio (p. ej. solución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro de resolución temporal (p. ej., Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (LM) y la liberación espontánea (LE) se determinan mediante la incubación de las células diana con TX-100 al 1 % y medios solos, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide mediante la incubación de células diana y efectoras en ausencia de anticuerpo. Preferentemente, cada ensayo se realiza por triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como: liberación experimental (ADCC - AICC)/(LM-LE) x 100.
25
30

Caracterización del anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 3H7

35 Unión directa de diferentes lotes de cultivos de hibridoma

Las uniones directas de diferentes lotes de cultivos de hibridoma a FcγRIIA y FcγRIIB se compararon usando un ensayo ELISA (Figura 1A). Se ensayó la unión específica de los sobrenadantes numerados 1, 4, 7, 9 y 3 y su unión se comparó con un anticuerpo comercialmente disponible, FL18.26. Como se muestra en la Figura 1A (panel izquierdo), el sobrenadante del clon 7 tiene la máxima unión a FcγRIIB, que es aproximadamente cuatro veces mayor bajo condiciones saturantes que la unión del anticuerpo comercialmente disponible a FcγRIIB. Sin embargo, el sobrenadante del clon 7 no tiene apenas afinidad por FcγRIIA, como se observa en el panel derecho, mientras que el anticuerpo comercialmente disponible une FcγRIIA al menos cuatro veces mejor.
40

Unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 3H7 a FcγRIIA y FcγRIIB

Se midió la unión del sobrenadante 3H7 en bruto y del sobrenadante de 3H7 purificado (Figura 1B). En cada caso, el sobrenadante se suministró a una concentración de 70 µg/ml y se diluyó hasta 6 veces. Como se muestra en la Figura 1, bajo condiciones saturantes, el sobrenadante de 3H7 une FcγRIIB cuatro veces mejor de lo que une FcγRIIA. Tras la purificación con una columna de proteína G, la unión absoluta del sobrenadante de 3H7 a cada inmunógeno mejora.
45

Bloqueo de la unión de IgG humana agregada a FcγRIIB por el anticuerpo producido a partir del clon 3H7

50 Si el anticuerpo presente en el sobrenadante del hibridoma une FcγRIIB en el sitio de unión de IgG y bloquea la unión de IgG, entonces la IgG agregada no puede unir el receptor y, por tanto, no puede detectarse nada de absorbancia a 650. El anticuerpo, en efecto, es un "agente bloqueante" que bloquea el sitio de unión de IgG en FcγRIIB. Como control, se llevó a cabo el ELISA sin bloqueo, con un sobrenadante de control y con sobrenadante del clon 3H7. Como se muestra en la Figura 2, el sobrenadante de 3H7 bloquea completamente la unión de IgG, ya que la IgG agregada no puede unir el receptor, como resulta evidente a partir de la falta de absorbancia a 650 nm. Sin embargo, el sobrenadante de control no consigue bloquear la unión de IgG; la IgG agregada une el receptor como resulta evidente mediante la lectura a 650 nm. El sobrenadante de control se comporta de manera similar a la situación en la que no se realizaba bloqueo.
55

Comparación de la unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 3H7 a FcγRIIB bacteriano y de mamífero

5 Como se muestra en la Figura 3, el sobrenadante del clon 3H7, se une de forma comparable a FcγRIIB bacteriano y de mamífero. Bajo condiciones saturantes, el sobrenadante de 3H7 une FcγRIIB bacteriano y de mamífero aproximadamente tres veces mejor de lo que une FcγRIIA. El anticuerpo monoclonal del clon 3H7 es, por tanto, capaz de unirse específicamente a FcγRIIB de mamífero que se ha modificado postraduccionalmente (p. ej., glucosilación).

Unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 3H7 a FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIA

Las uniones directas del sobrenadante de los cultivos de hibridoma de la línea celular 3H7 a FcγRIIA, FcγRIIA y FcγRIIB se compararon usando un ensayo ELISA (Figura 4).

10 El anticuerpo producido a partir del clon 3H7 no tiene nada de afinidad por FcγRIIA y une FcγRIIB con una afinidad aproximadamente 4 veces mayor que con la que une FcγRIIA.

Caracterización del anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 2B6

Comparación de la unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 2B6 comparada con otros tres anticuerpos monoclonales frente a FcγRII comercialmente disponibles

15 La unión del anticuerpo producido a partir del clon 2B6 a FcγRIIA y FcγRIIB se compara con la de otros tres anticuerpos comercialmente disponibles, AT10, FL18.26 e IV.3, frente a FcγRII en un ensayo ELISA. Como se observa en el panel A de la Figura 5, el anticuerpo producido a partir del clon 2B6 une FcγRIIB hasta 4,5 veces mejor que los demás anticuerpos comercialmente disponibles. Adicionalmente, el anticuerpo producido a partir del clon 2B6 tiene una afinidad mínima por FcγRIIA, mientras que los otros tres anticuerpos comercialmente disponibles unen FcγRIIA de manera saturable y el doble de lo que el anticuerpo del clon 2B6 une FcγRIIA (Figura 5, panel B).

Bloqueo de IgG humana agregada a FcγRIIB por el anticuerpo producido a partir del clon 2B6.

25 Se estudió la capacidad del anticuerpo producido a partir del clon 2B6 para bloquear la unión de IgG agregada a FcγRIIB mediante un ensayo ELISA de bloqueo y se comparó con la del anticuerpo producido por el clon 3H7. Como se muestra en la Figura 6A, el sobrenadante de control no une FcγRIIB en el sitio de unión de IgG y la IgG agregada puede unirse al receptor y, por tanto, la absorbancia a 650 nm es máxima. El clon 3H7, sin embargo, bloquea la unión de IgG hasta el 75 %. El clon 2B6 bloquea completamente la unión del sitio de unión de IgG y no permite que la IgG agregada una el receptor, e incluso a diluciones muy elevadas, no se detecta absorbancia a 650 nm. La figura 6B representa los datos en un diagrama de barras.

Competición del anticuerpo de 2B6 e IgG agregada en la unión a FcγRIIB usando ensayos FACS de tinción doble

30 Se usó un ensayo FACS de doble tinción para caracterizar el anticuerpo producido a partir del clon 2B6 en células CHO que se habían transfectado con FcγRIIB de mamífero de longitud completa.

35 Como se muestra en el panel C de la Figura 7, el anticuerpo producido a partir del clon 2B6 bloquea eficazmente la unión de IgG agregada al receptor FcγRIIB en células CHO, ya que no se observa tinción para la IgG agregada biotinilada después de que se preincubaran las células con anticuerpo monoclonal. Las células se tiñen solamente en el panel inferior derecho, lo que indica que la mayoría de las células se unieron al anticuerpo monoclonal del clon 2B6. En los experimentos de control, usando IgG1 como el isotipo de control, panel A, cuando las células se tiñen la IgG de isotipo marcada, no se observa tinción, ya que que la IgG monomérica no se une a FcγRIIB con ninguna afinidad detectable, mientras que en el panel B, aproximadamente el 60 % de las células se tiñen con IgG agregada, que es capaz de unir FcγRIIB.

Co-tinción de anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB y CD20 de linfocitos B humanos

45 Se usó un ensayo FACS de doble tinción para caracterizar el anticuerpo producido a partir de clones 2B6 y 3H7 en linfocitos B humanos. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD20 que estaba conjugado con FITC para seleccionar la población de linfocitos B, así como los anticuerpos producidos a partir de los clones 3H7 y 2B6, marcados con peroxidasa anti-ratón de cabra. El eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD20 y el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia del anticuerpo monoclonal. Como se muestra en los paneles B y C de la Figura 8, las células se someten a tinción doble con el anticuerpo anti-CD20, así como con los anticuerpos producidos a partir de los clones 2B6 y 3H7, aunque el anticuerpo producido a partir del clon 2B6 muestra una tinción más intensa que el producido a partir del clon 3H7. El panel A muestra la tinción del control de isotipo, IgG1 de ratón.

Tinción de células CHO que expresan FcγRIIB

Se tiñeron células CHO que expresan FcγRIIB de forma estable con control de isotipo IgG1 (Figura 9A, panel izquierdo) o con sobrenadante del hibridoma de 3H7 (Figura 9B; panel derecho). El anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-ratón de cabra se usó como anticuerpo secundario. Las células se analizaron después por FACS; las células que se tiñen con el sobrenadante del hibridoma de 3H7 muestran una señal de fluorescencia fuerte y un desplazamiento del pico hacia la derecha; lo que indica la detección de FcγRIIB en las células CHO mediante el sobrenadante producido a partir del hibridoma de 3H7. Las células teñidas con el sobrenadante del hibridoma de 2B6 también muestran una fluorescencia significativa, en comparación con células teñidas con IgG1, y desplazamiento del pico hacia la derecha, lo que indica la detección de FcγRIIB en las células CHO mediante el sobrenadante obtenido a partir de hibridoma de 2B6.

Inhibición de la liberación de B-hexosaminidasa por 2B6

Los transfectantes que expresaban FcγRIIB humano fueron sensibilizados con IgE de ratón y expuestos a fragmentos F(ab')₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal para agregar FcεRI. El entrecruzamiento se produce debido a la capacidad del anticuerpo policlonal para reconocer la cadena ligera del anticuerpo de IgE murina unido a FcεRI. Este experimento se muestra esquemáticamente en la Figura 10A. Los transfectantes sensibilizados con IgE murina y preincubados con anticuerpo de 2B6 también fueron expuestos a fragmentos F(ab')₂ de una IgG anti-ratón de cabra policlonal para entrecruzar FcεRI con FcγRIIB. Como se muestra en la Figura 10B, se observó una liberación de β-hexosaminidasa de una magnitud menor cuando las células que se preincubaron con anticuerpo de 2B6 e IgE se expusieron a F(ab')₂ de anti-ratón de cabra. Como se observa en la Figura 10B, el anticuerpo de 2B6 no bloquea la actividad del receptor inhibitor. Al contrario, el entrecruzamiento con FcεRI activa la ruta inhibitora y da como resultado una disminución significativa de la liberación de β-hexosaminidasa. Estos datos también muestran que el receptor FcγRIIB inhibitor humano puede señalizar de forma eficaz en basófilos de rata.

Ensayos de ADCC *in vitro*

Con el fin de determinar si las células IGROV-1, OVCAR-8 y SKBR-3 expresan el antígeno Her2neu, las células se tiñeron con anticuerpos ch4D5 o 4D5 purificados en hielo; el anticuerpo no unido se retiró por lavado con tampón PBS/BSA que contenía azida de sodio y la unión de 4D5 o ch4D5 se detectó mediante anticuerpo conjugado con PE anti-ratón de cabra o anti-humano de cabra (Jackson Laboratories), respectivamente. Un anticuerpo de IgG1 no pertinente (Becton Dickinson) sirvió como control de la unión no específica. Como se muestra en la Figura 11, las líneas celulares tumorales ováricas expresan menos antígenos Her2neu que la línea celular de carcinoma de mama y la evaluación de estas líneas celulares en paralelo determinará la rigurosidad de la eliminación del tumor por un anticuerpo anti-FcγRIIB divulgado en el presente documento.

Los monocitos humanos son la población efectora implicada en la ADCC que expresa receptores tanto activadores como inhibidores. La expresión de FcγR se ensayó mediante análisis FACS usando varios lotes de monocitos congelados, ya que estas células se transferirán adoptivamente como efectores para estudiar el papel de ch2B6 en la eliminación del tumor. Se descongelaron monocitos elutriados congelados obtenidos comercialmente en medio basal que contenía suero AB humano al 10 % y en medio basal con suero humano y 25 - 50 ng/ml de GM-CSF. Las células se tiñeron directamente o se dejaron madurar a macrófagos durante 7-8 días (MDM), se despegaron del plástico y después se tiñeron con IV.3-FITC (anti-huFcγRIIA), 32.2-FITC (anti-FcγRI), CD16-PE (Pharmingen) o 3G8 (anti-FcγRIII)-de cabra-anti-ratón-PE, 3H7 (anti-FcγRIIB) y marcador CD14 para monocitos (Pharmingen), junto con controles de isotipo pertinentes. En la Figura 12 se muestra un perfil de FACS representativo de MDM de dos donantes, representando la expresión de FcγR en monocitos recién descongelados y monocitos cultivados. Estos resultados indican que FcγRIIB se expresa moderadamente en monocitos (5-30 %, dependiendo del donante). No obstante, esta expresión se incrementa a medida que maduran a macrófagos. Los datos preliminares muestran que los macrófagos que infiltran tumores en especímenes de tumores humanos se tiñen positivamente para FcγRIIB (datos no mostrados). Se descubrió que el patrón de FcγR y la capacidad de diferenciarse morfológicamente a macrófagos era reproducible en varios lotes de monocitos congelados. Estos datos indican que esta fuente de células es adecuada para experimentos de transferencia adoptiva.

Ch4D5 media la ADCC eficaz con líneas celulares de cáncer de ovario y de mama usando PBMC

Se ensayó la actividad ADCC del anticuerpo anti-Her2/neu en un ensayo a base de europio. La línea celular ovárica, IGROV-1, y la línea celular de cáncer de mama, SKBR-3, se usaron como dianas marcadas en un ensayo de 4 h con LSP como células efectoras humanas. La figura 13 indica que ch4D5 es funcionalmente activo en la mediación de la lisis de dianas que expresan Her2neu. Posteriormente, se mide el efecto de un anticuerpo de la invención sobre la actividad ADCC del anticuerpo anti-Her2/neu.

Actividad *in vivo* de anticuerpos frente a FcγRIIB en modelos murinos de xenoinjerto usando líneas celulares tumorales humanas

Se usan ratones atímicos Balb/c hembra de seis a ocho semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME; Taconic) para establecer los modelos de xenoinjerto de carcinoma ovárico y de mama. Los ratones se mantienen en BIOCON, Inc. Rockville, Maryland (véase el protocolo adjunto). Los ratones se alojan en instalaciones de Biosafety

Level-2 para el modelo de xenoinjerto usando las células derivadas de ascitis de ovario y células de cáncer de mama derivadas de derrame pleural como fuentes de tumores. Los ratones se colocan en grupos de 4 para estos experimentos y se monitorizan tres veces por semana. Se registran el peso de los ratones y el tiempo de supervivencia y los criterios para tumores en crecimiento son la distensión abdominal y los tumores palpables. Los ratones que muestran signos de incomodidad evidente o que alcanzan 5 g de peso del tumor se someten a eutanasia con dióxido de carbono y se realiza la autopsia. Los animales tratados con anticuerpo estarán bajo observación durante otros dos meses más que el grupo de control.

Establecimiento del modelo de tumor de xenoinjerto con líneas celulares tumorales

Con el fin de establecer el modelo de tumor de xenoinjerto, se inyectan s.c. 5×10^6 células viables IGROV-1 o SKBR-3 en ratones atímicos lampiños hembra de edad y peso concordantes con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor se calcula mediante la fórmula: longitud x (anchura)²/2 y no debe exceder de 3 gramos. Para someter a las células a expansión *in vivo*, puede aislarse un tumor dependiente de anclaje y pueden disociarse las células añadiendo 1 µg de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor a 37 °C durante la noche.

La inyección de células IGROV-1 s.c. da lugar a tumores de crecimiento rápido, mientras que la vía i.p. induce una carcinomatosis peritoneal que mata a los ratones en 2 meses. Dado que las células IGROV-1 forman tumores en un plazo de 5 semanas, en el día 1 después de la inyección de células tumorales, se co-inyectan i.p. monocitos como efectores junto con anticuerpos terapéuticos ch4D5 y ch2B6 a 4 µg de cada uno por g de peso corporal del ratón (mbw) (Tabla 8). La inyección inicial va seguida de inyecciones semanales de anticuerpos durante las 4-6 semanas posteriores. Las células efectoras humanas se reponen una vez cada dos semanas. Un grupo de ratones no recibirá ningún anticuerpo terapéutico pero se le inyectará ch4D5 N297A e IgG1 humana como anticuerpos de control de isotipo para el anticuerpo antitumoral y ch2B6, respectivamente.

Tabla 8: Resumen de los estudios de eliminación del tumor con anticuerpo anti-Her2neu, ch4D5 y ch2B6, anticuerpo anti-FcγRIIB en un modelo de tumor de xenoinjerto en ratones atímicos con monocitos humanos transferidos adoptivamente como efectores de ADCC. MWB (peso corporal del ratón).

8 ratones/grupo	Célula tumoral s.c día 0	Monocitos i.p en el día 1	ch4D5 a 4 µg/g de mbw día 1 i.p	ch4D5 N297A a 4 µg/g de mbw día 1 i.p	ch2B6 N297A a 4 µg/g de mbw día 1 i.p	IgG1 humana 4 µg/g de mbw día 1 i.p
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

Como se muestra en la Tabla 8, se necesitan 6 grupos de 48 ratones cada uno para ensayar el papel de un anticuerpo anti-FcγRIIB en la eliminación del tumor con una combinación de diana y efector, con dos combinaciones diferentes de concentraciones de los anticuerpos. Estos grupos son A) células tumorales, B) células tumorales y monocitos, C) células tumorales, monocitos, anticuerpo antitumoral, ch4D5, D) células tumorales, monocitos, anticuerpo antitumoral ch4D5 y un anticuerpo anti-FcγRIIB, p. ej., ch2B6, E) células tumorales, monocitos y un anticuerpo anti-FcγRIIB, p. ej., ch2B6 y F) células tumorales, monocitos, ch4D5 N297A e IgG1 humana. Pueden ensayarse diversas combinaciones de concentración de anticuerpo en esquemas similares.

En paralelo se llevan a cabo estudios usando la línea célula de cáncer de mama, SKBR-3, con el modelo de IGROV-1, ya que las células SKBR-3 sobreexpresan Her2neu. Esto incrementará la rigurosidad de la evaluación del papel del anticuerpo anti-FcγRIIB en la eliminación de tumores. Basándose en los resultados de los estudios de eliminación de tumores con las células IGROV-1, se realizan modificaciones en el diseño experimental de futuros experimentos con otras dianas.

El criterio de valoración del modelo de tumor de xenoinjerto se determina basándose en el tamaño de los tumores (peso de los ratones), el tiempo de supervivencia y el informe histológico para cada grupo de la Tabla xx. Los ratones se monitorizan tres veces por semana; los criterios para tumores en crecimiento son la distensión abdominal y la presencia de masas palpables en la cavidad peritoneal. Se calculan estimaciones del peso del tumor frente a los días transcurridos desde la inoculación. Basándose en esos tres criterios de los ratones del grupo D de la Tabla 8 frente a los demás grupos de ratones se definirá el papel de los anticuerpos anti-FcγRIIB en la potenciación de la eliminación

de tumores. Los ratones que muestran signos de dolor evidente o que alcanzan 5 gramos de peso del tumor se someten a eutanasia con dióxido de carbono y se realiza la autopsia. Los animales tratados con anticuerpo se someten a seguimiento durante dos meses después de este punto temporal.

5 **Actividad *in vivo* de anticuerpos frente a FcγRIIB en un modelo murino de xenoinjerto con células derivadas de carcinoma de mama y ovárico primario humano**

Se establecen tumores primarios a partir de cánceres de mama y ovárico primarios transfiriendo células tumorales aisladas a partir de exudados de pacientes con carcinomatosis. Con el fin de trasladar estos estudios al ámbito clínico, el modelo de xenoinjerto se evalúa con células tumorales derivadas de ascitis y derrame pleural de dos pacientes con carcinoma ovárico y dos con carcinoma de mama, respectivamente. Se han usado derrame pleural, como una fuente de células de cáncer de mama, y la implantación de tejido de mama maligno para establecer modelos murinos de xenoinjerto con éxito, véase, p. ej., Sakakibara y col., 1996, Cancer J. Sci. Am. 2: 291. Estos estudios determinarán el amplio intervalo de aplicación del anticuerpo anti-FcγRIIB en la eliminación de tumores de células primarias. La eliminación de tumores se ensaya usando anticuerpo antitumoral, ch4D5 y anticuerpo anti-FcγRIIB, p. ej., ch2B6, en un modelo de ratón atímico Balb/c con monocitos humanos transferidos adoptivamente.

15 **Células tumorales primarias derivadas de ascitis y derrame pleural humanos**

El St. Agnes Cancer Center, Baltimore, Maryland, proporciona ascitis de pacientes con cáncer ovárico y derrames pleurales de pacientes con cáncer de mama. La ascitis y el derrame pleural de los pacientes puede contener un 40-50 % de células tumorales y se usarán muestras con una alta expresión de células tumorales Her2neu+ para establecer los modelos de xenoinjerto.

20 Se ensaya la expresión de las muestras de ascitis y derrame pleural para evaluar la expresión de Her2neu en células neoplásicas antes de establecer el modelo de tumor de xenoinjerto. Se determinará el porcentaje de las células neoplásicas frente a otros subgrupos celulares que pueden influir en el establecimiento del modelo de tumor. La ascitis y el derrame pleural de pacientes con cáncer ovárico y de mama, respectivamente, se analizan de forma rutinaria para determinar el nivel de expresión de Her2neu+ en las células neoplásicas. Para determinar el porcentaje de células neoplásicas Her2neu+ en las muestras clínicas se usan análisis FACS. Las muestras con un alto porcentaje de células neoplásicas Her2neu+ se seleccionan para el inicio de tumores en ratones Balb/c.

Histoquímica e inmunohistoquímica

30 Se realizan histoquímica e inmunohistoquímica en ascitis y derrame pleural de pacientes con carcinoma ovárico para analizar las características estructurales de la neoplasia. Los marcadores que se monitorizan son citoqueratina (para identificar células mesoteliales y neoplásicas ováricas de células inflamatorias y mesenquimales); calretinina (para separar células mesoteliales de neoplásicas positivas para Her2neu); y CD45 (para separar células inflamatorias del resto de la población celular de las muestras). Los marcadores adicionales que se seguirán incluyen CD3 (linfocitos T), CD20 (linfocitos B), CD56 (linfocitos NK) y CD14 (monocitos).

35 Para la tinción inmunohistoquímica, se preparan secciones congeladas y tejidos parafinados mediante técnicas estándar. Las secciones congeladas, así como las desparafinadas, se tiñen con un protocolo de tinción similar. La peroxidasa endógena de los tejidos se desactiva sumergiendo los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 3 % y se lava con PBS durante 5 minutos. Las secciones se bloquean y el anticuerpo primario ch4D5 se añade en suero de bloqueo durante 30 minutos, seguido del lavado de las muestras con PBS tres veces. El anticuerpo secundario anti-humano conjugado con biotina se añade durante 30 minutos y después se lavan los portaobjetos en PBS durante 5 minutos. Se añade complejo de peroxidasa avidina-biotina (Vector Labs) durante 30 minutos, seguido de lavado. El color se revela incubando los portaobjetos en solución DAB de sustrato recién preparada y la reacción se detiene mediante lavado con agua corriente. Para la tinción H y E, los portaobjetos se desparafinan y después se hidratan en diferentes concentraciones de alcohol. Los portaobjetos se lavan con agua corriente y se ponen en hematoxilina durante 5 minutos. Se retira el exceso de tinción con ácido-alcohol, seguido de amoníaco y agua. Los portaobjetos se ponen en eosina, seguido de lavados en alcohol del 90 al 100 % para su deshidratación. Finalmente, los portaobjetos se ponen en xileno y se montan con fijador para su almacenamiento a largo plazo. En todos los casos, el porcentaje de células tumorales se determina mediante tinción de Papanicolaou.

Tinción histoquímica

50 Las ascitis de dos pacientes diferentes con carcinoma ovárico se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y Giemsa para analizar la presencia de células tumorales y otros tipos celulares. El resultado de la tinción histoquímica se muestra en la Figura 14.

Modelos murinos

55 Se procesan muestras de pacientes con carcinoma ovárico sedimentando por centrifugación la ascitis a 6370 g durante 20 minutos a 4 °C, lisando los glóbulos rojos seguido del lavado de las células con PBS. Basándose en el porcentaje de células tumorales Her2neu+ de cada muestra, se seleccionan dos muestras, una que expresa un nivel medio y otra alto, para la inoculación s.c. para establecer el modelo de xenoinjerto para evaluar el papel del anticuerpo

anti-FcγRIIB en la eliminación de tumores. Se ha informado de que las células tumorales suponen hasta el 40-50 % del subgrupo celular de ascitis no procesada y, después de la purificación, se obtuvieron $\sim 10\text{-}50 \times 10^6$ células tumorales a partir de 2 litros de ascitis (Barker y col., 2001, Gynecol. Oncol. 82: 57-63). Las células de ascitis aisladas se inyectan i.p en ratones para expandir las células. Se inyectarán i.p. aproximadamente 10 ratones y la ascitis de cada ratón se llevará además a dos ratones para obtener ascitis de un total de 20 ratones, que se usa para inyectar un grupo de 80 ratones. El derrame pleural se maneja de una manera similar a la ascitis y las células tumorales Her2neu+ se inyectan en las almohadillas mamarias derechas e izquierdas superiores en Matrigel. Después de la inoculación s.c de células tumorales, se realiza un seguimiento de los cambios clínicos y anatómicos de los ratones. En caso necesario, pueden realizarse autopsias de los ratones para correlacionar la carga tumoral total con la localización específica en los órganos.

Listado de secuencias

<110> Koenig, Scott

Veri, Maria Concetta

5 <120> Anticuerpos monoclonales anti-FcgRIIB y su uso en la potenciación de la respuesta inmunitaria

<130> 11183-003

<140>

<141>

<150> 60/403,266

10 <151> 2002-08-14

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 363

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caggccaat tgcagcagcc tgtgactgag ctggtgagggc cgggggcttc agtgatgttg      60
tcctgcaagg cttctgacta ccccttcacc aactactgga tacactgggt aaagcagagg      120
cctggacaag gcctggagtg gatcggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac      180
aataaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagtcg taccctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcagcctgac atctgacgat tctgcggtct attactgtgc aagaaacggt      300
gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc      360
tca                                                                                   363

```

<210> 2

20 <211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 381 617 T3

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

Ser Val Met Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Val Val Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga gagagtcagt 60
ttttcctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtatca gcaaagaaca 120
aatggttttc caaggcttct cataaagaat gtttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttattctta gcatcaacag tgtggagtct 240
gaagatattg cagattatta ttgtcaacaa agtaatacct ggccggtcac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 4

10 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 381 617 T3

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo de IgG aislado o uno de sus fragmentos que unen específicamente el dominio extracelular de FcγRIIB expresado de forma endógena en una célula humana con una afinidad al menos 10 veces mayor que con la que dicho anticuerpo o fragmento unen FcγRIIA expresado de forma endógena en una célula humana, en el que dicha unión es a través del dominio variable.
2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que la región variable de dicho anticuerpo bloquea la unión de un Fc de Ig a FcγRIIB.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, que potencia la activación de linfocitos B, la proliferación celular de linfocitos B, la entrada de calcio intracelular, la actividad de una molécula de señalización corriente abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB o una respuesta celular dependiente de anticuerpos.
- 10 4. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo activa la señalización mediada por el receptor de linfocitos B o inhibe la activación de mastocitos mediada por FcεR1.
5. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo compite por la unión a FcγRIIB con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 2B6, con número de acceso de ATCC PTA-4591, o con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 3H7, con número de acceso de ATCC PTA-4592.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo humano.
7. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho fragmento es un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F(ab).
- 20 8. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho anticuerpo o fragmento une el dominio extracelular de FcγRIIB con una afinidad al menos 100 veces mayor que con la que dicho dominio variable une FcγRIIA.
9. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento biespecífico que comprende una primera pareja de cadena pesada-cadena ligera que une específicamente FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicha pareja de cadena pesada-cadena ligera une FcγRIIA, y una segunda pareja de cadena pesada-cadena ligera que une un antígeno tumoral.
- 25 10. El anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une de manera operable a un agente terapéutico, una citotoxina o un polipéptido heterólogo, en el que dicho polipéptido heterólogo es un anticuerpo que une inmuno-específicamente un receptor de superficie celular.
- 30 11. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 10, en el que dicho receptor de superficie celular es un antígeno tumoral.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 8-11 que comprende una región Fc, que comprende además al menos una modificación en la región Fc que modifica la afinidad de la región Fc de dicho anticuerpo por un FcγR.
- 35 13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en el que dicha región Fc une FcγRIIIA con una afinidad mayor que con la que un anticuerpo comparable que comprende una región Fc natural une FcγRIIIA.
14. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de la reivindicación 3 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente.
- 40 15. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
16. El uso de la reivindicación 14 o el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho medicamento o tratamiento es para su uso en combinación con un segundo anticuerpo que une específicamente un antígeno canceroso y es citotóxico, en el que dicho cáncer se caracteriza por dicho antígeno canceroso.
- 45 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho antígeno canceroso es MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, beta-catenina, MUM-1, CDK4, HER-2/neu, papilomavirus-E6 humano, papilomavirus-E7 humano o MUC-1.
- 50 18. El uso de la reivindicación 14 o el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho medicamento o tratamiento es para su uso en combinación con un segundo anticuerpo que no media su efecto terapéutico mediante muerte celular.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-Fas.
- 5 20. Uso del anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 y una composición de vacuna, estando dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto frente a dicha composición de vacuna en la preparación de una composición farmacéutica para potenciar una respuesta inmunitaria frente a dicha composición de vacuna en dicho sujeto.
21. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 para su uso en la potenciación de la respuesta inmunitaria frente a una composición de vacuna, en el que dicho uso es en combinación con dicha composición de vacuna.
- 10 22. Una composición farmacéutica que comprende:
- (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13; y
 - (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que dicho anticuerpo o fragmento potencia la activación de linfocitos B, la proliferación celular de linfocitos B, la entrada de calcio intracelular, la actividad de una molécula de señalización corriente abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB o una respuesta celular dependiente de anticuerpos, y en la que dicha composición comprende adicionalmente un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno canceroso.

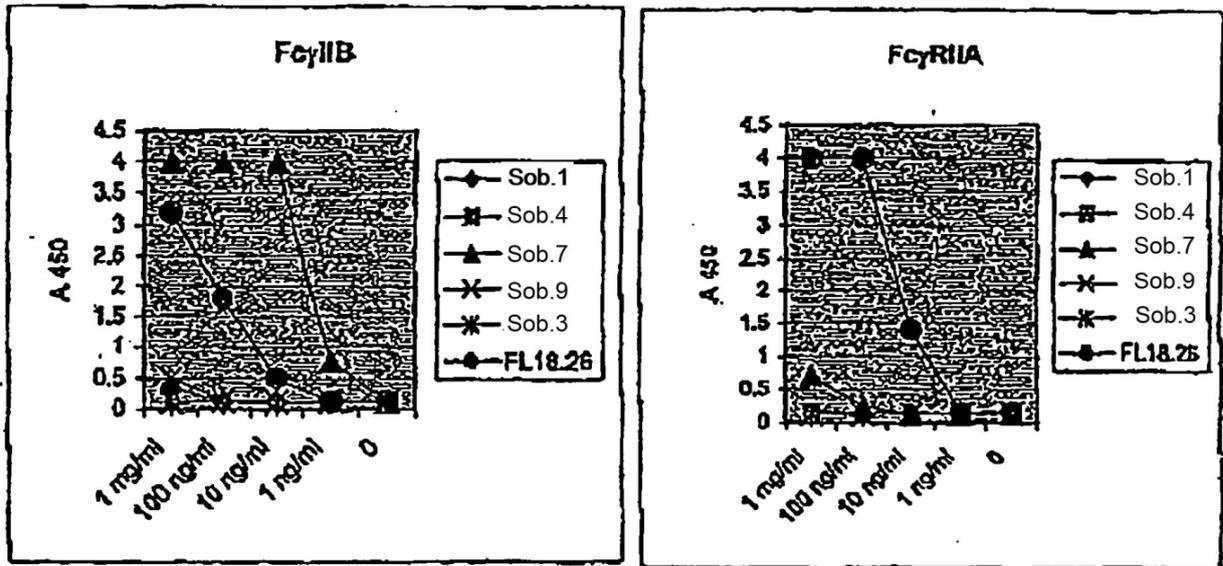


FIG. 1A

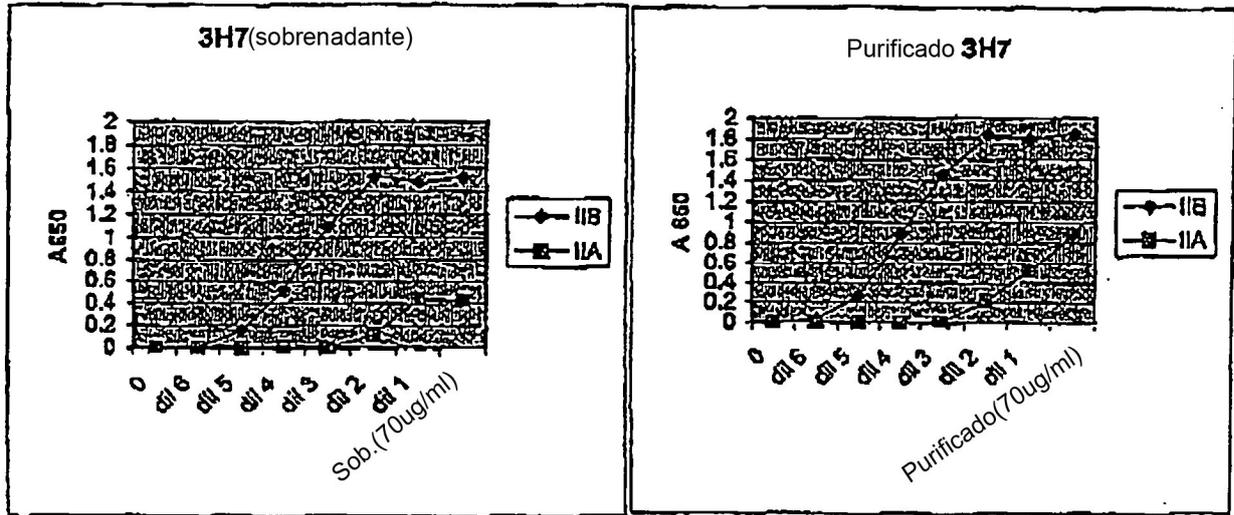


FIG. 1B

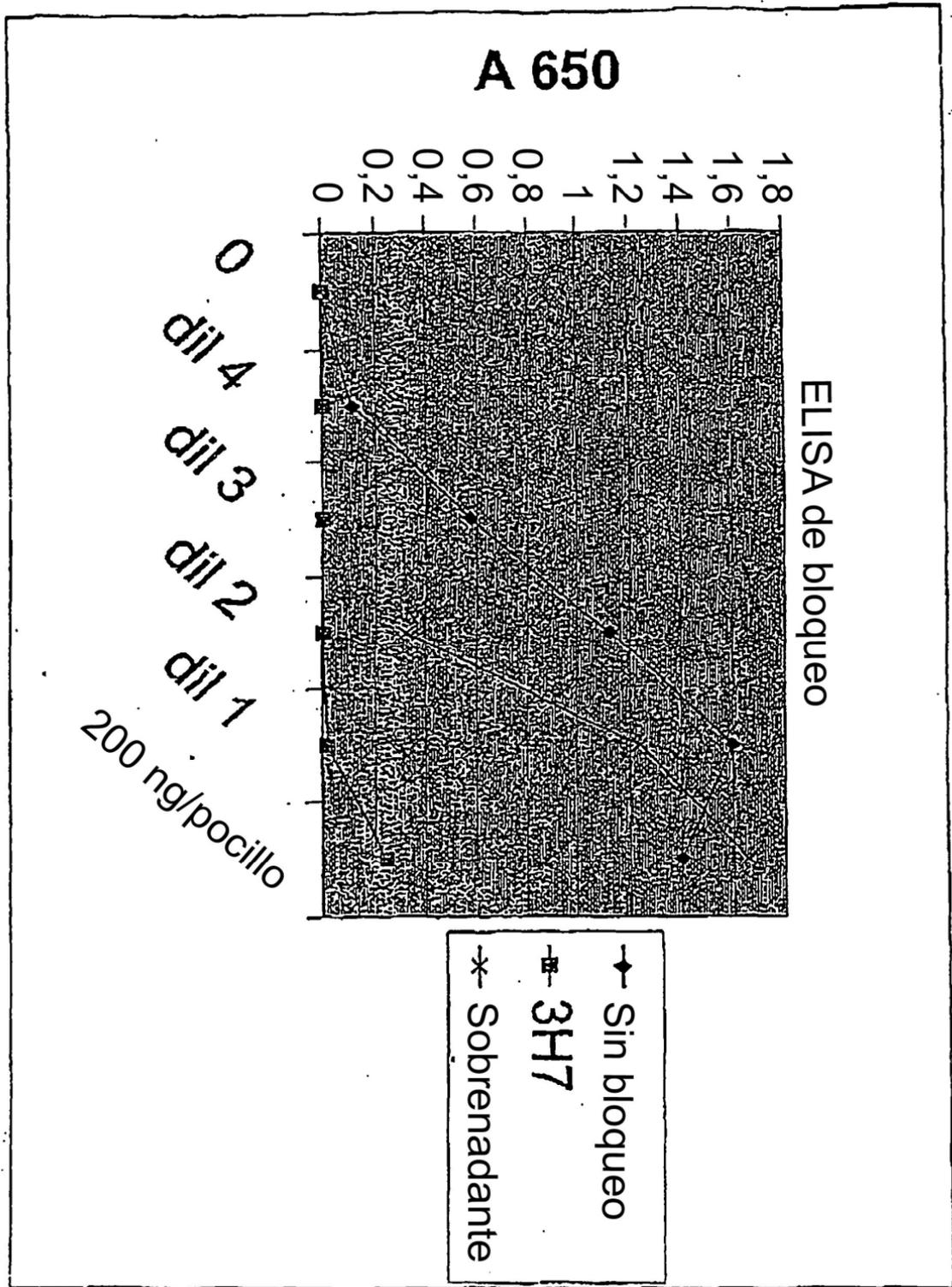


FIG. 2

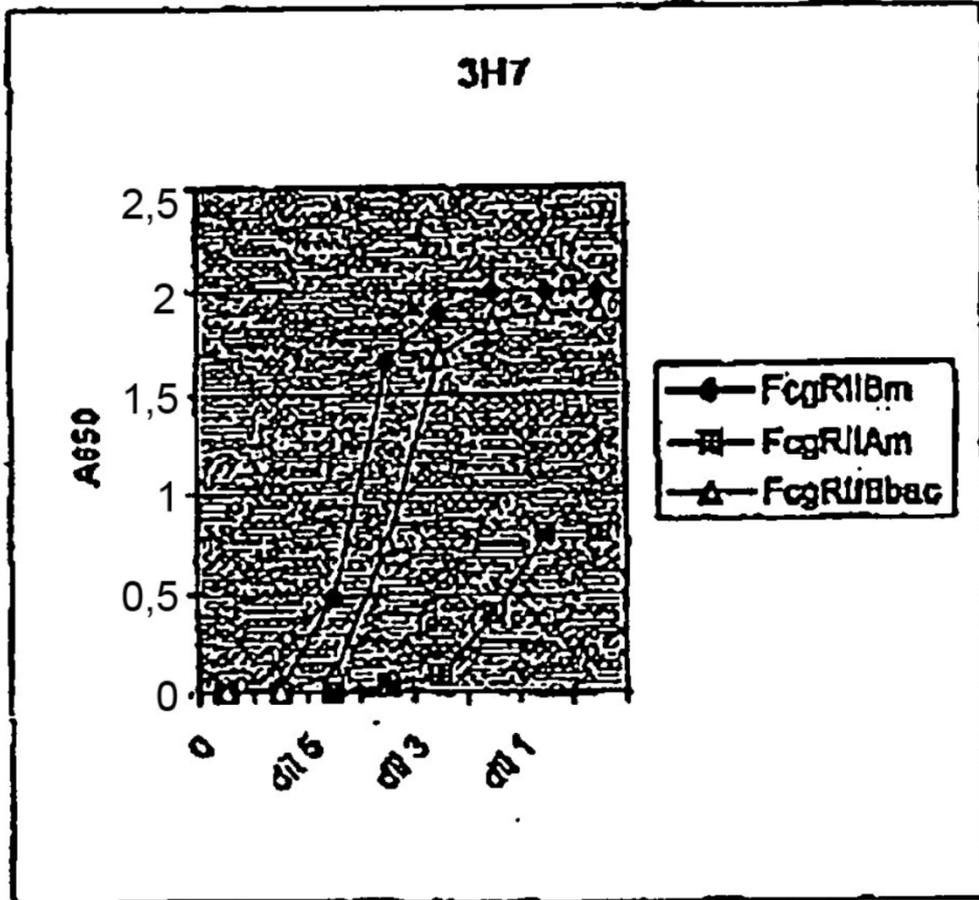


FIG. 3

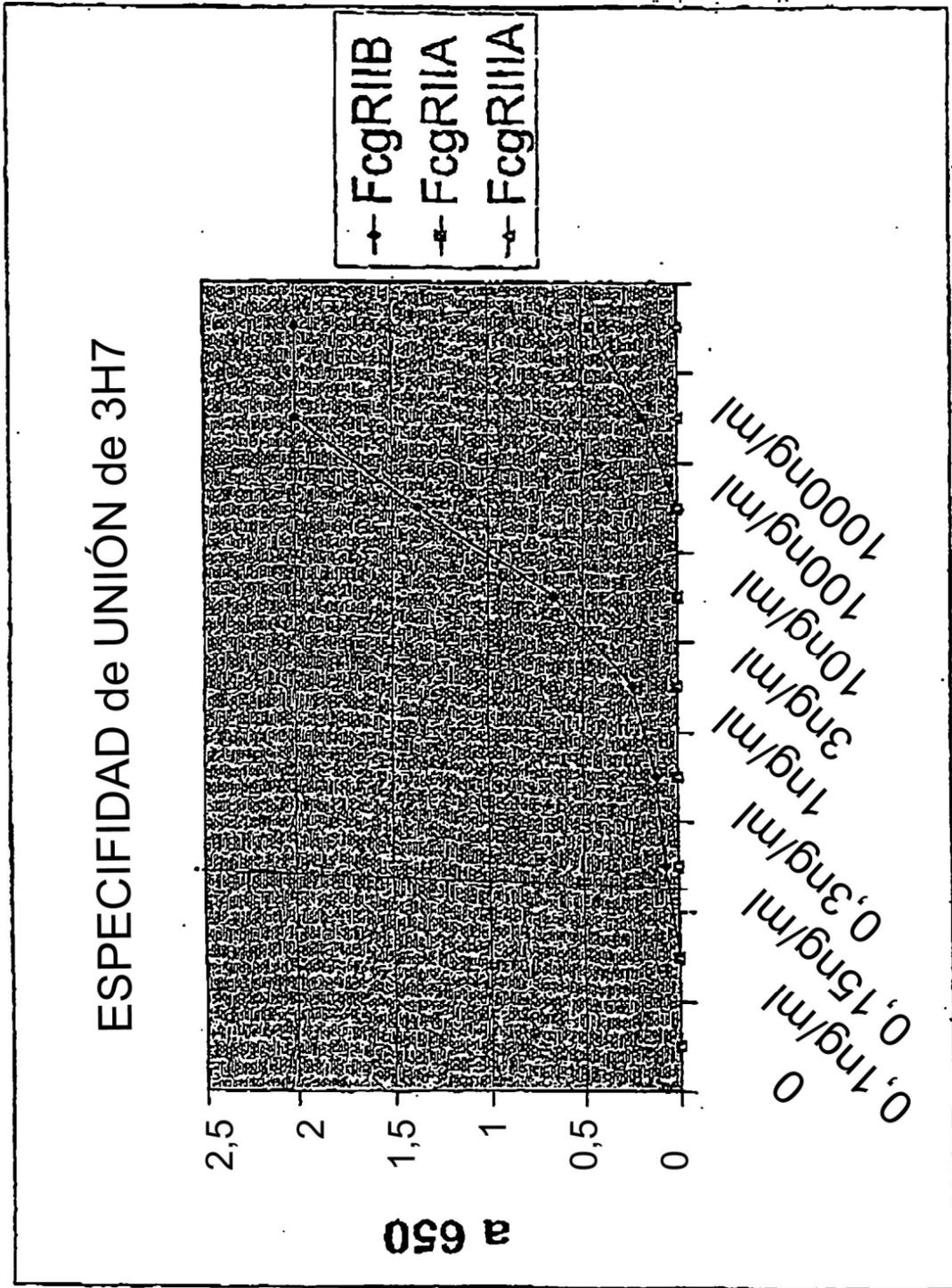


FIG. 4

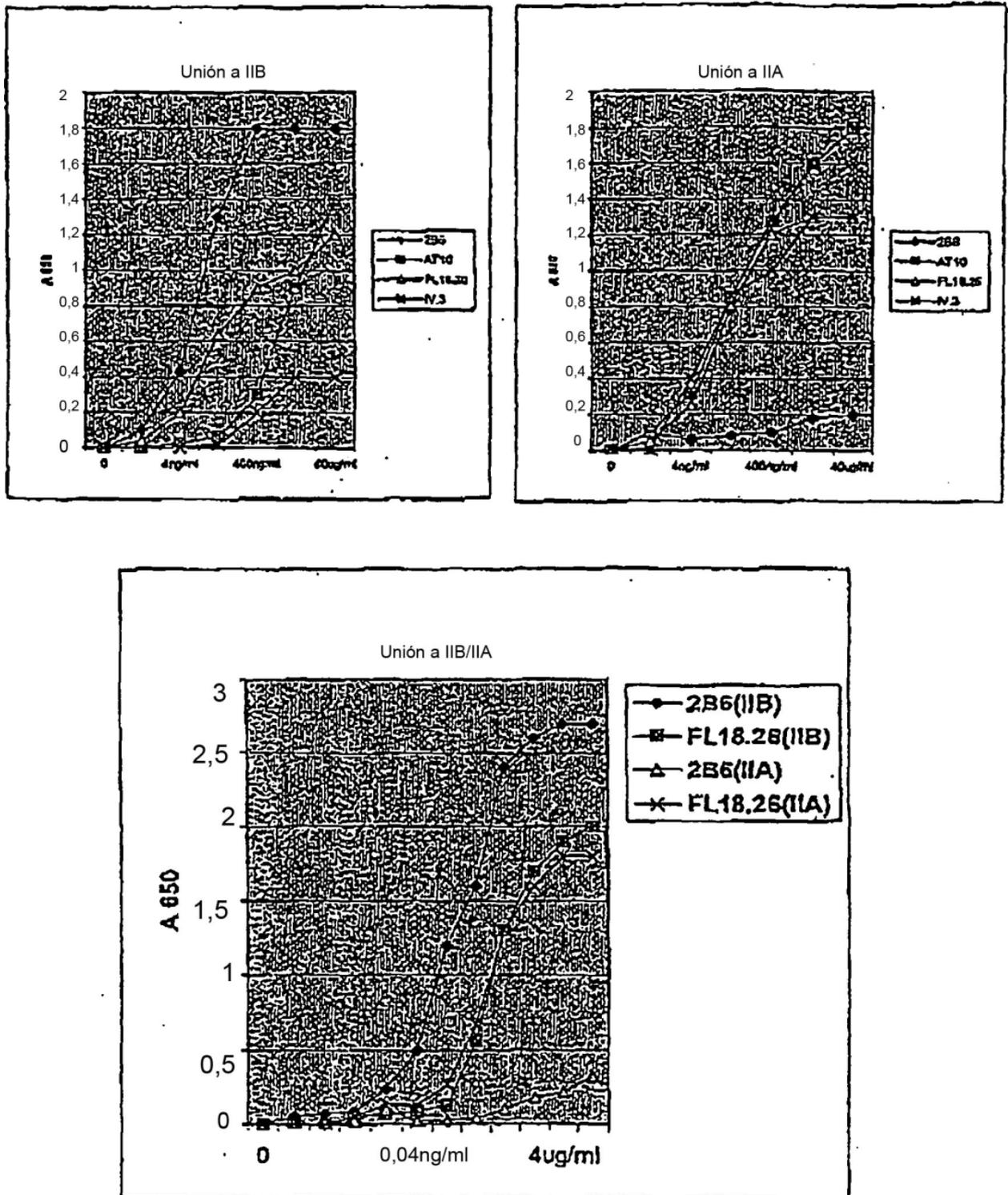
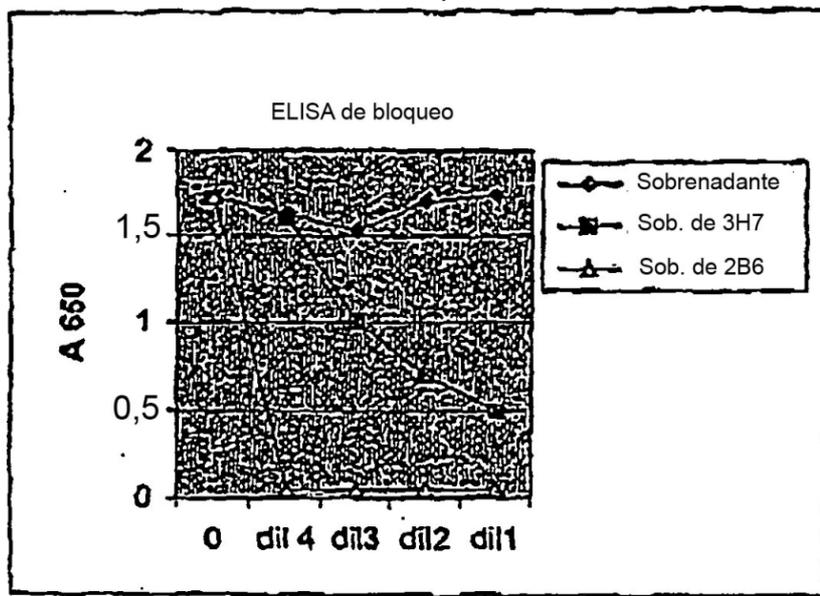


FIG. 5

A



B

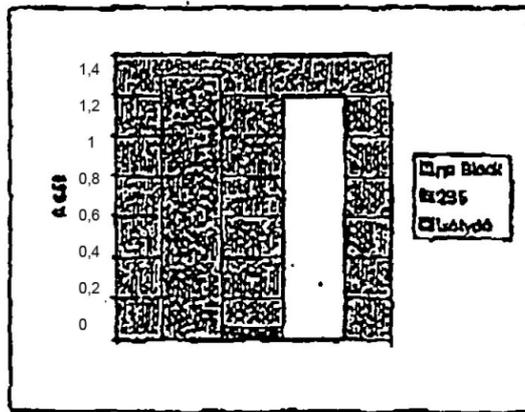
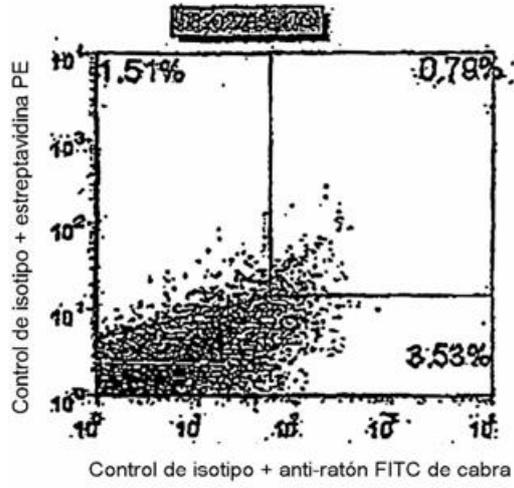
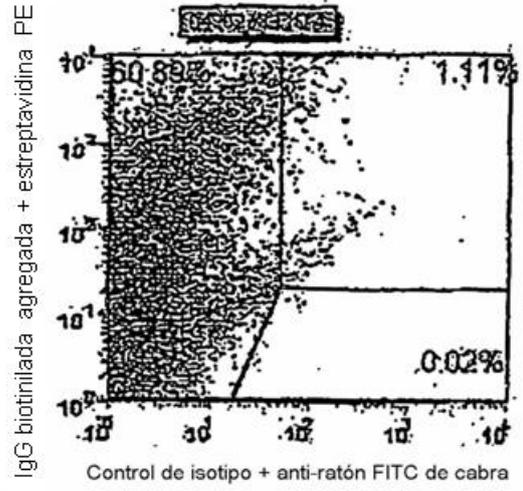


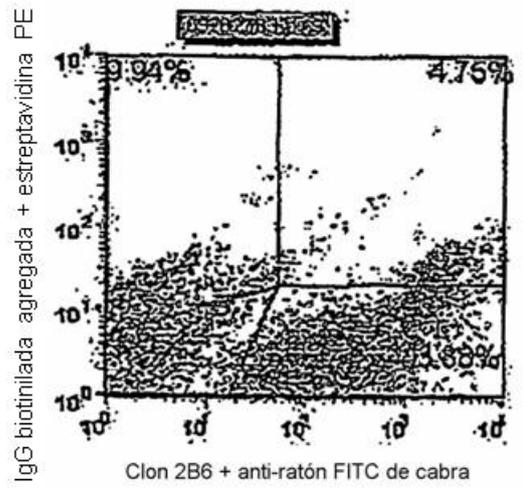
FIG. 6



A



B



C

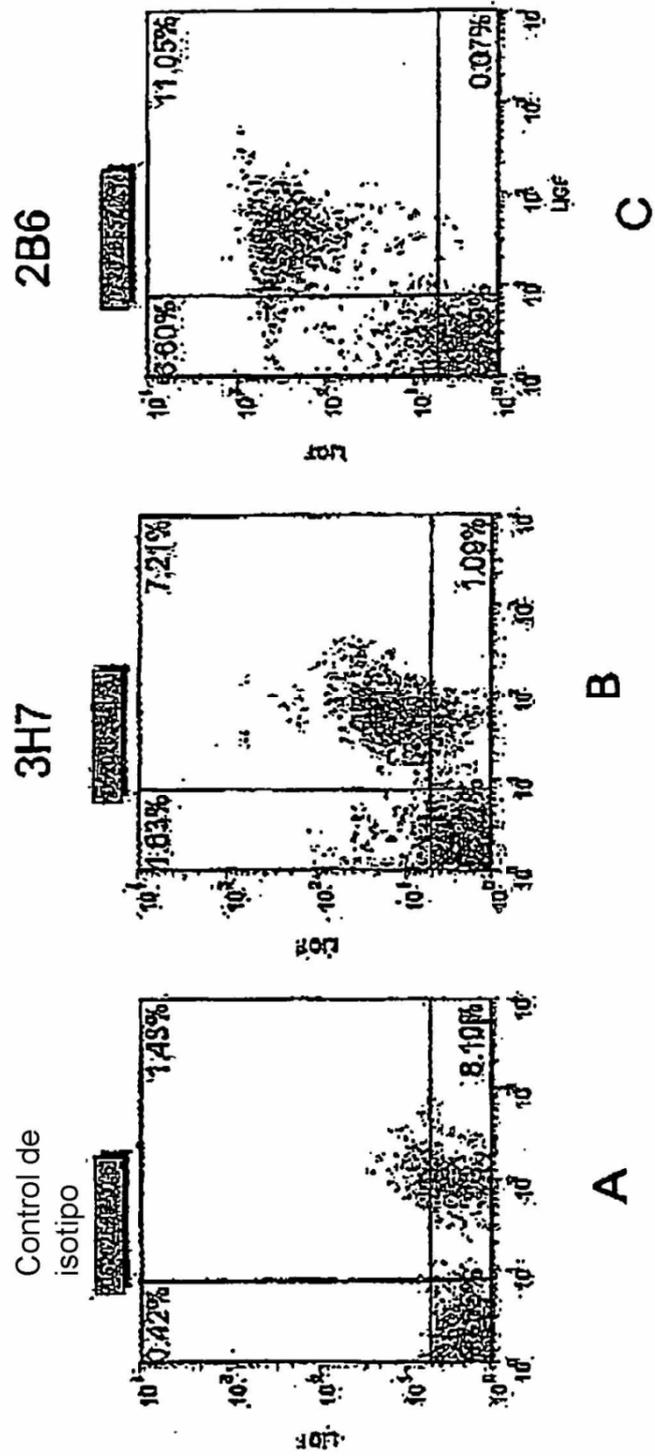


FIG. 8

FIG. 9A

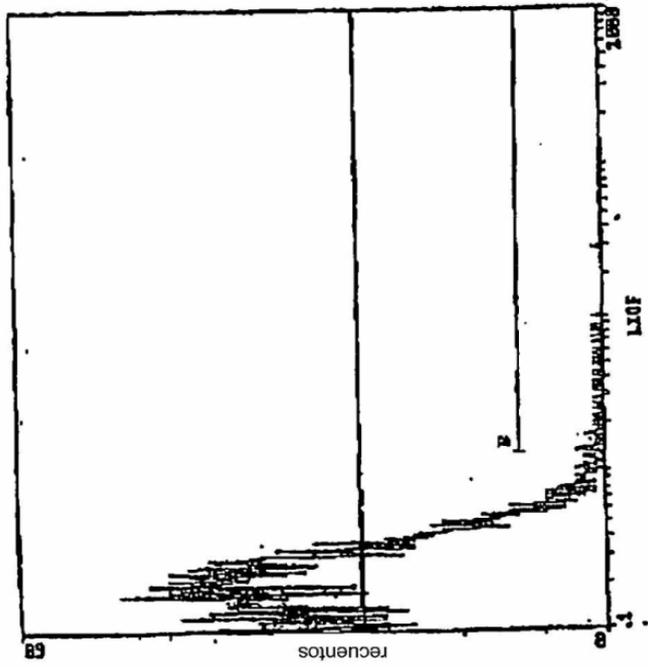
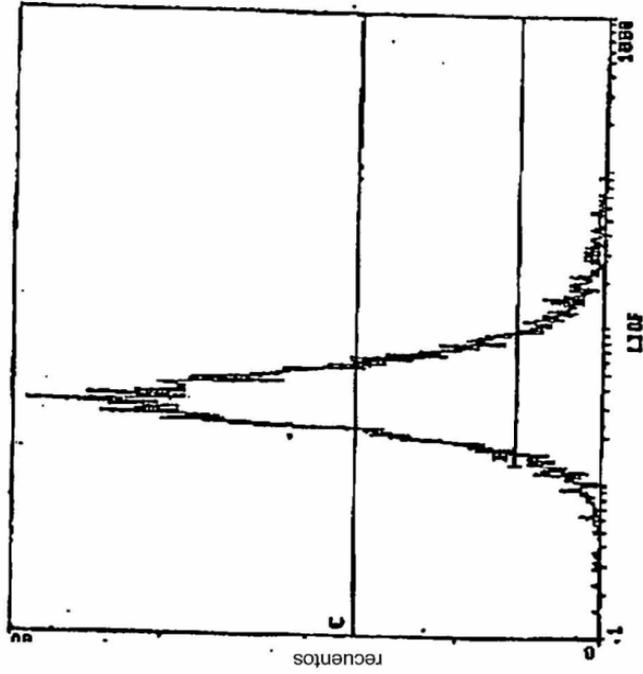
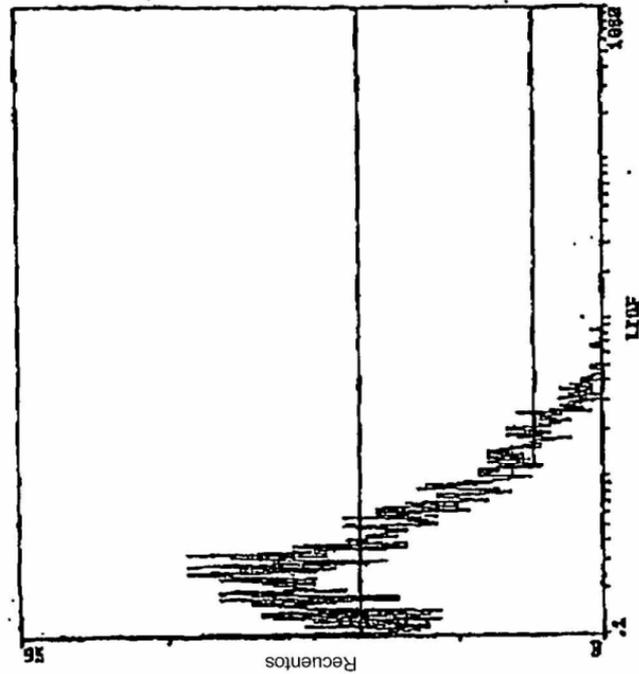
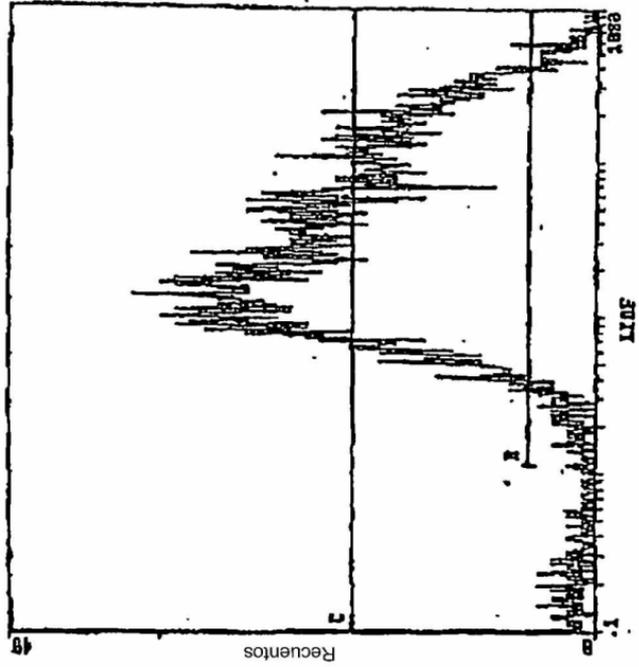


FIG. 9B



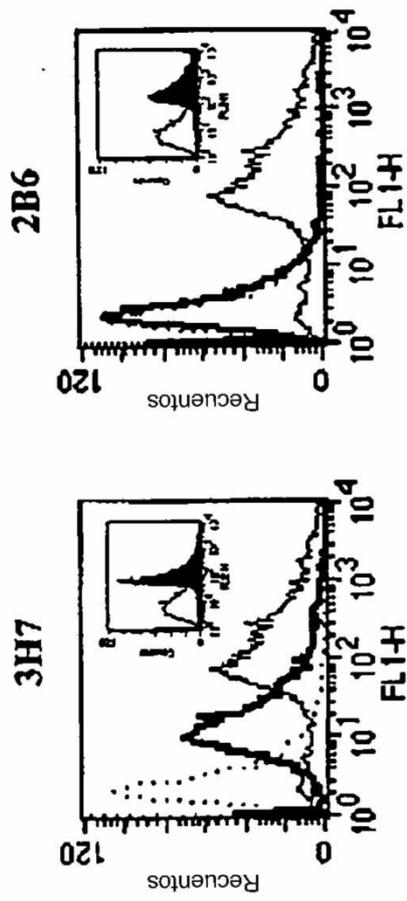


Figura 10. Se incubaron células CHO que expresaban huFcγRIIB con los anticuerpos anti CD32B, 2B6 o 3H7. Las células se lavaron y se añadieron 9 µg/ml de IgG humana agregada a las células en hielo. Las IgG humanas agregadas se detectaron con anti-IgG humana conjugado con FITC de cabra. Las muestras se analizaron por FACS.....control de isotipo + anti-huIgG-FITC de cabra, ----- control de isotipo + IgG humana agregada + anti-IgG humana-FITC de cabra, ----- anticuerpo anti-CD32B + IgG humana agregada + anti-IgG humana-FITC de cabra. La cantidad de cada anticuerpo unido a receptores de las células también se detectó (incluido) en un conjunto de muestras separado usando anticuerpo anti-ratón conjugado con PE de cabra.

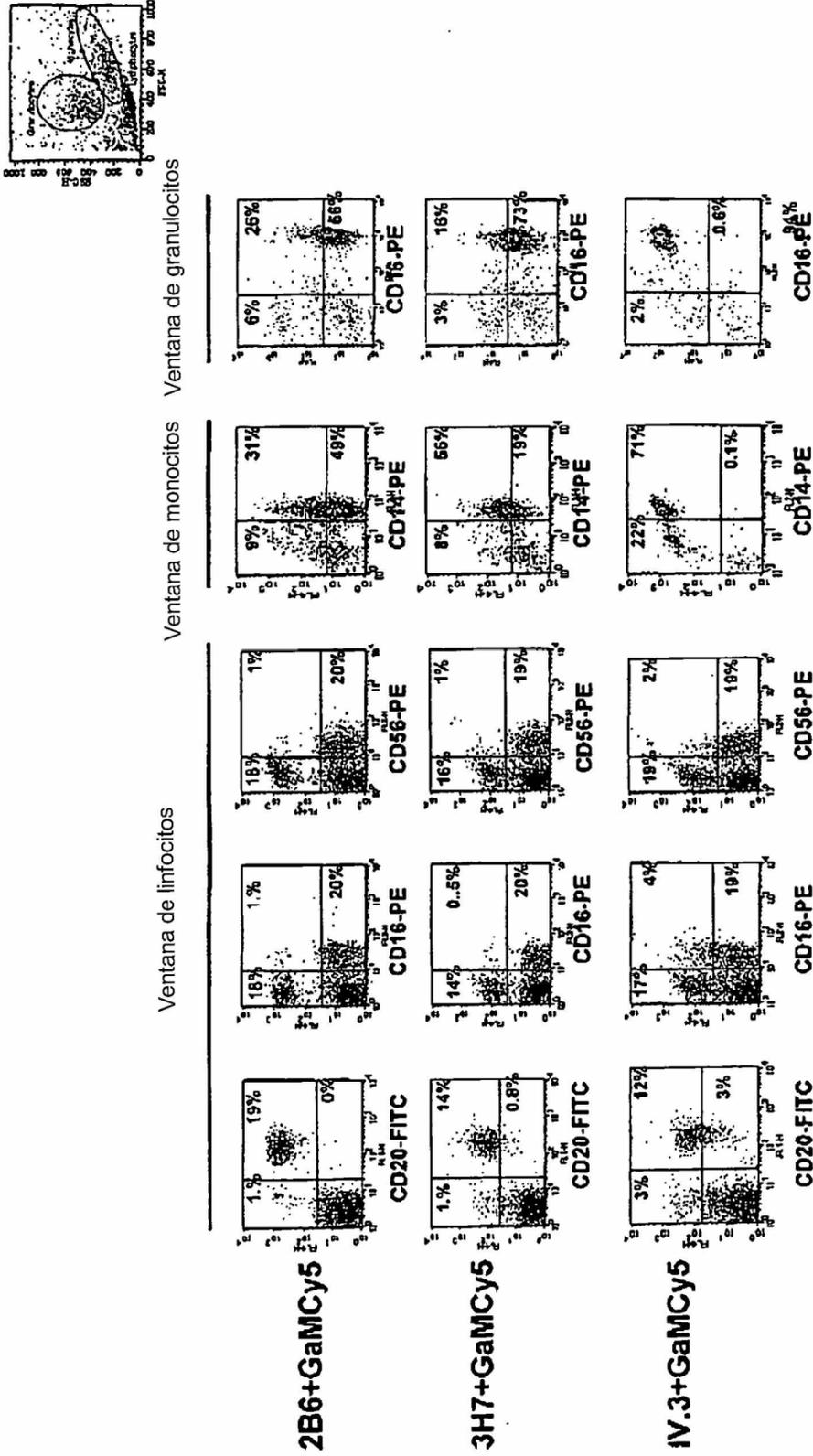


Figura 11. Se tiñeron PBMC humanas con anticuerpos 2B6, 3H7 e IV.3, como se indica en el lado derecho del panel, seguido de un anticuerpo conjugado anti-ratón-cianina (Cy5) de cabra (tinción bicolor usando anti-CD20 conjugado con FITC para linfocitos B, anti-CD14 conjugado con PE para monocitos, anti-CD56 conjugado con PE para linfocitos NK y anti-CD16 conjugado con PE para granulocitos).

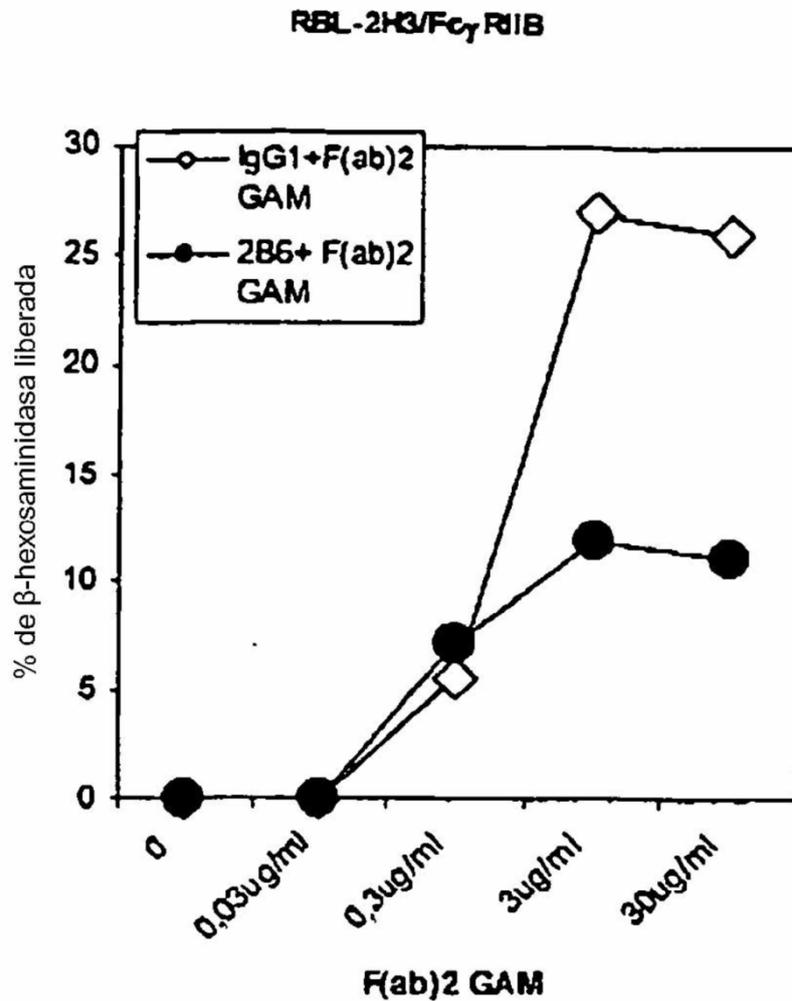


Figura 12. Liberación de B-hexosaminidasa inducida por fragmento F(ab)₂ de anti-ratón de cabra (GAM F(ab)₂) en células RBL-2H3 que expresan huFc γ RIIB. Las células se estimularon con diversas concentraciones de GAM F(ab)₂ (0,03 µg/ml a 30 µg/ml) tras la sensibilización con IgE de ratón (0,01 µg/ml) e IgG1 o con el grupo de anticuerpos 2B6 purificado (3 µg/ml). Después de 1 hora a 37 °C se recogió el sobrenadante y las células se lisaron. La actividad β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante y dentro de las células se determinó mediante un ensayo colorimétrico usando p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosamínido. La actividad β-hexosaminidasa liberada se expresó como un porcentaje de la actividad liberada con relación a la actividad total.

Expresión de Her2neu en la superficie celular de líneas celulares de cáncer ovárico y de mama

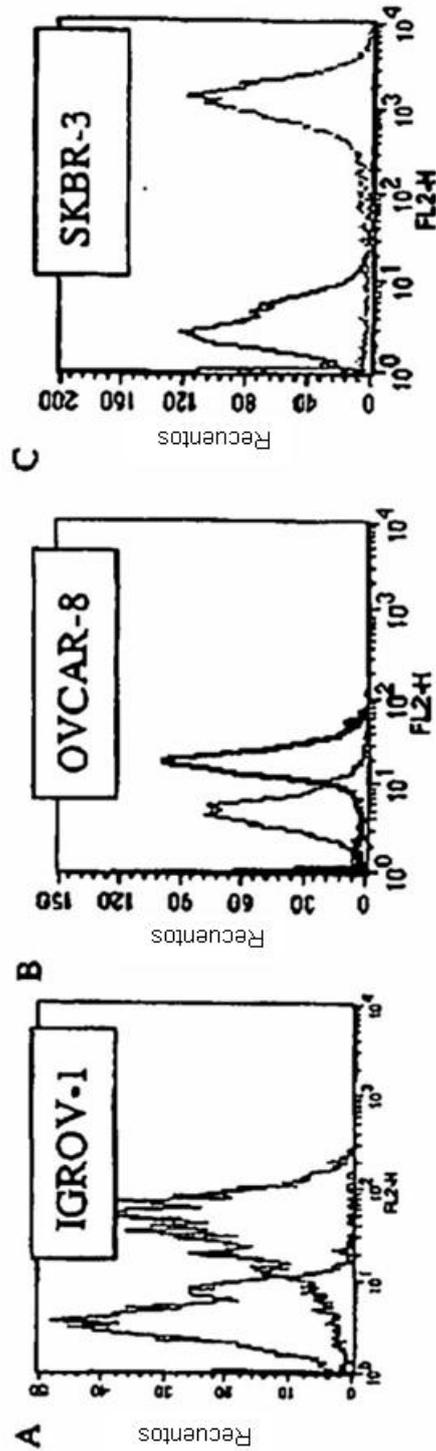


Figura N.º 4. Las líneas celulares de carcinoma ovárico y de mama expresan Her2neu a niveles variables. Tinción de A) IGROV-1 ováricas con ch4D5 purificado, B) OVCAR-8 ováricas con anticuerpo 4D5 purificado y C) células SKBR-3 de cáncer de mama con ch4D5 purificado seguido de anti-humano conjugado con ficoeritrina (PE) de cabra. La IgG1 de control de isotipo pertinente se indica a la izquierda de la tinción con anticuerpo anti-Her2neu.

Fig. 14

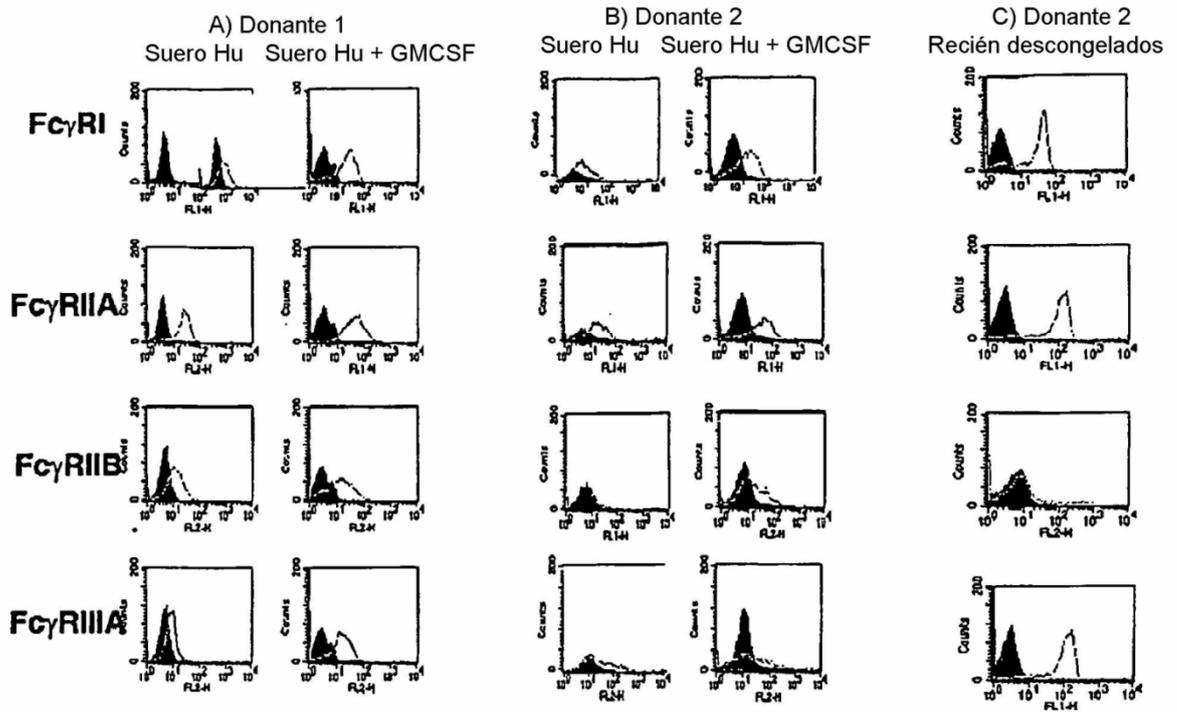


Figura 6. Los monocitos elutriados expresan todos los FcγR: A) MDM obtenido del donante 1, B) del donante 2, se propagaron en suero humano o suero humano y GMCSF y C) monocitos descongelados y teñidos inmediatamente. Los macrófagos derivados de monocitos se teñieron con anticuerpos específicos para receptor FcγR humano, (sección C.4). El área oscura de cada gráfica representa la tinción de base. El área clara dentro de cada panel representa la tinción con anticuerpos anti-FcγR humano específicos.

FIGURA N.º 7

A)

B)

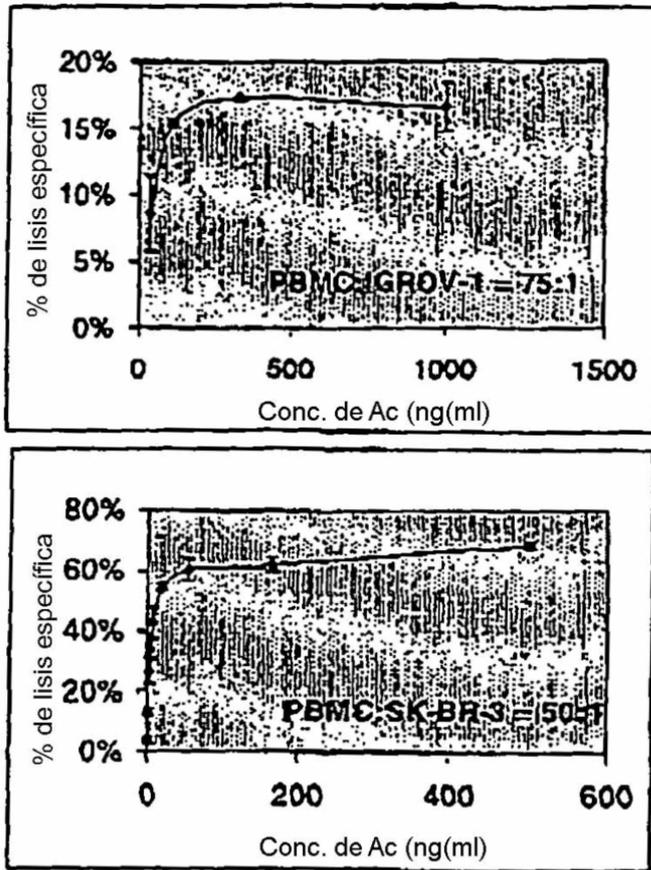


Figura N.º 7. Ch4D5 media la ADCC eficaz con líneas celulares de cáncer ovárico y de mama usando PBMC. La lisis específica sustraída de la lisis independiente de anticuerpos se muestra para A) línea celular tumoral de ovario, IGROV-1 a una proporción efector:diana de 75:1 y para B) línea celular tumoral de mama, SKBR-3 a una proporción efector:diana de 50:1 con diferente concentración de ch4D5, como se indica.

FIGURA N.º 5

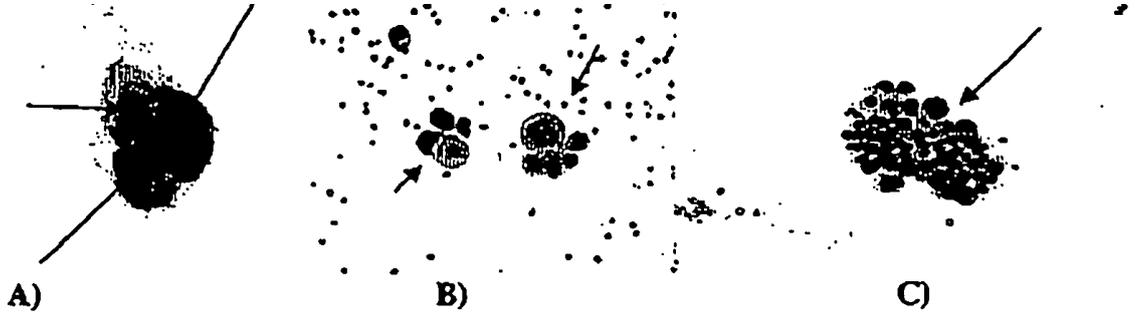


Figura N.º 5. La tinción histoquímica de ascitis ovárica humana muestra células tumorales y otras células inflamatorias. A) Tinción H y E en ascitis de una paciente con tumor ovárico. Pueden identificarse tres células neoplásicas por el tamaño y forma irregulares, citoplasma disperso y núcleos de densidad irregular. B) Tinción de Giemsa de ascitis no procesada de una paciente con tumor seroso del ovario muestra dos células mesoteliales situadas juntas indicadas con flechas cortas. También se muestra un conjunto de cinco células epiteliales malignas indicado por la flecha larga. Los eritrocitos son visibles en el fondo. C) Tinción de Giemsa de otra paciente con tumor seroso del ovario que indica un conjunto de células compuesto por células mesoteliales, linfocitos y células epiteliales neoplásicas (flecha).