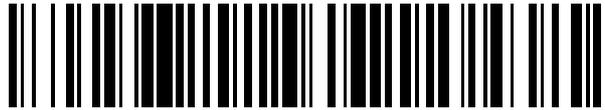


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 646**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2007 E 07873826 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2021029**

54 Título: **Anticuerpos humanizados específicos a Fc gamma RIIB y sus métodos de uso**

30 Prioridad:

26.05.2006 US 809116 P
23.06.2006 US 816126 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2014

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9640 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S. y
HUANG, LING

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 489 646 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 humanizados específicos a Fc gamma RIIB y sus métodos de uso.

5 2. Campo de la invención

La presente invención se relaciona con anticuerpos humanizados de Fc γ RIIB, fragmentos y variantes de estos que se unen a Fc γ RIIB humano con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo se une a Fc γ RIIA. Además la invención incluye los anticuerpos humanizados de la invención para uso en el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con la pérdida del equilibrio de la señalización mediada por el receptor Fc, tal como cáncer (preferentemente una malignidad de célula B, particularmente, leucemia linfocítica crónica de células B o linfoma de no Hodgkin), enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria o trastorno alérgico mediado por IgE. La presente invención abarca además los anticuerpos humanizados de Fc γ RIIB de la invención o un fragmento de unión a antígeno de este, para el uso en conjunto con otras terapias contra el cáncer. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en métodos para mejorar el efecto terapéutico de los anticuerpos terapéuticos administrando los anticuerpos humanizados de la invención para mejorar la función efectora de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en métodos para mejorar la eficacia de una composición de vacuna administrando los anticuerpos humanizados de la invención con una composición de vacuna.

20 3. Antecedentes de la invención

3.1 Receptores Fc y su papel en el sistema inmunológico

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

Los receptores de Fc, miembros de la superfamilia de proteínas de genes de inmunoglobulina, son glicoproteínas de superficie que pueden unir la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en una cadena del receptor Fc. Los receptores Fc se definen por su especificidad para los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se denominan como Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R, y para IgA como Fc α R. Diferentes células accesorias portan receptores Fc para anticuerpos de isotipo diferente, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias participarán en una respuesta determinada (revisado por Ravetch J.V. y otros 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. y otros 2001 Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. y otros 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-168; Ravetch J.V. y otros 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J. V. y otros, 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores Fc, las células que los expresan, y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptado de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ta edición 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Otra técnica anterior relativa a tal materia objeto incluye WO 2006113665 la cual se dirige a moléculas de diacuerpo y sus usos en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, que incluyen trastornos inmunológicos, enfermedades infecciosas, intoxicación y cáncer. Las moléculas de diacuerpo descritas en la misma comprenden dos cadenas de polipéptidos que se asocian para formar al menos dos sitios de unión al epítipo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes en antígenos iguales o distintos. Además, los antígenos pueden ser de moléculas iguales o diferentes. Las cadenas individuales de polipéptido de la molécula de diacuerpo pueden estar unidas covalentemente a través de enlaces covalentes de enlace no peptídico, tales como, pero sin limitarse a, puente disulfuro de residuos de cisteína situados dentro de cada cadena de polipéptido. En modalidades particulares, las moléculas de diacuerpo de la presente invención comprenden además una región Fc, que permite la funcionalidad similar al anticuerpo para modificar en la molécula.

WO 2007021841 se relaciona con moléculas, particularmente polipéptidos, más particularmente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una variante de región Fc, en donde dicha variante de región Fc comprende al menos una modificación de aminoácidos respecto a una región Fc silvestre, cuya variante de región Fc se une a Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIIA con una afinidad mayor, respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc silvestre. Las moléculas descritas en las mismas son particularmente útiles al impedir, tratar, o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección. Las moléculas descritas en las mismas son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno donde se desea una eficacia mejorada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por Fc γ R, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, y para mejorar la eficacia terapéutica de los anticuerpos terapéuticos cuyo efecto se media por ADCC.

WO 2005115452 se relaciona con anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano. Se proporciona además el uso de un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión al antígeno de este, como una terapia de agente único para el tratamiento, prevención, manejo, o mejora de un cáncer, preferentemente una malignidad de célula B, particularmente, leucemia linfocítica crónica de células B o linfoma de no Hodgkin, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico mediado por IgE, o uno o más de sus síntomas. Además, se proporcionan métodos para mejorar el efecto terapéutico de los anticuerpos terapéuticos administrando los anticuerpos descritos en la misma para mejorar la función efectora de los anticuerpos terapéuticos. Se describen además los métodos para mejorar la eficacia de una composición de vacuna administrando dichos anticuerpos.

Receptores Fcγ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína de membrana integral, que posee los dominios extracelulares relacionados a un conjunto C2 de dominios relacionados con la inmunoglobulina, un único dominio de inmuoadsorción de membrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen tres FcγRs conocidos, designados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), y FcγRIII(CD16). Los tres receptores se codifican por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que provinieron de un progenitor común quizás por la duplicación de genes. Esta invención se centra específicamente en FcγRII(CD32).

FcγRII(CD32)

Las proteínas FcγRII son glicoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que unen sólo la IgG acomplejada debido a una baja afinidad por el Ig monomérico (10^6 M^{-1}). Este receptor FcγR es el más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, que incluyen monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII tiene sólo dos regiones similar a inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y de ahí una afinidad mucho menor por IgG que FcγRI. Existen tres genes FcγRII humanos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales unen IgG en agregados o complejos inmunológicos.

Las diferencias distintas dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A (CD32A) y FcγRII-B (CD32B) crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas para la ligación de los receptores. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tales como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia las señales inhibitoras, por ejemplo, inhibición de la activación de células B.

Señalización a través de FcγRs

Tanto las señales de activación como inhibitoras se transducen a través de los FcγRs a continuación de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamado inmunoreceptor de tirosina basado en motivos de activación (ITAMs) o inmunoreceptor de tirosina basado en motivos inhibitoras (ITIMs) justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contiene ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solamente incluyen FcγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación FcγRIIA a través de complejos inmunológicos o reticulación de anticuerpo específico sirve para agregar ITAMs junto con las quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación resulta en la activación de sustratos intermedios (*por ejemplo*, PI_3K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen FcγRIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico a FcγRIIA y une complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclase inhibitora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se co-liga junto con un activador FcγR, el ITIM en FcγRIIB se vuelve fosforilado y atrae el dominio SH2 del inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza mensajeros fosfoinositol liberados como una consecuencia de la activación de la tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM por consiguiente impidiendo la entrada de Ca^{++} intracelular. Así, la reticulación de FcγRIIB hace perder la respuesta de activación a la ligación de FcγR e inhibe la respuesta celular. La activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos así se interrumpe.

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 celular	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhan	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Células B Mastocitos	Células NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos ges Neutrófilos Eosinófilos ls
Efecto de Ligación	Captación Estimulación Activación de estallido respiratorio Inducción de la muerte.	Captación Liberación de gránulo	Captación Inhibición de la estimulación	No Captación Inhibición de la estimulación	Inducción de la Muerte	Secreción de gránulos	Captación Inducción de la muerte

3.2 Enfermedades de relevancia

3.2.1 Cáncer

Una neoplasia o tumor es una masa neoplásica que resulta del crecimiento celular anormal descontrolado que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligna" generalmente significa que el tumor puede invadir y destruir las estructuras del cuerpo vecinas y propagarse a sitios distantes para causar la muerte (para revisión, ver Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2da Edición, W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y se comporta de manera diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en que se originan y después se propagan a otra(s) parte(s) del cuerpo donde comienzan un nuevo crecimiento y causan más destrucción.

Más de 1.2 millones de estadounidenses desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y si las tendencias actuales continúan se espera que sea el cáncer la causa principal de la muerte en el año 2010. El cáncer de pulmón y próstata son los máximos cancerígenos para los hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y mama son los máximos cancerígenos para las mujeres en los Estados Unidos. Uno de cada dos hombres en los Estados Unidos serán diagnosticados con cáncer en algún momento durante su vida. Uno de cada tres mujeres en los Estados Unidos serán diagnosticadas con cáncer en algún momento durante su vida.

Una cura para el cáncer aún no se ha encontrado. Las opciones terapéuticas actuales, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación, son muchas veces ya sea ineficaces o presentan efectos secundarios graves.

3.2.1.1 Malignidades de células B

Las malignidades de células B, que incluyen, pero sin limitarse a, linfomas de células B y leucemias, son enfermedades neoplásicas con incidencia significativa en los Estados Unidos. Existen aproximadamente 55,000 nuevos casos de linfoma por año en los Estados Unidos (datos de 1998), con un estimado de 25,000 muertes por año. Esto representa el 4% de la incidencia de cáncer y el 4% de todas las muertes relacionadas con cáncer en la población de los Estados Unidos. La clasificación Europea-Americana de las neoplasias linfoides revisada (clasificación REAL de 1994, modificada en 1999), agrupa los linfomas basados en su origen ya sea como linfoma de linaje de células B, linfoma de linaje de células T, o linfoma de Hodgkin. El linfoma de linaje de células B es el tipo más común de linfoma de no Hodgkin (NHL) diagnosticado en Estados Unidos (Williams, Hematology 6ta edición (Beutler y otros Ed.), McGraw Hill 2001).

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es una enfermedad neoplásica caracterizada por la acumulación de linfocitos

pequeños, que aparecen maduros en la sangre, médula ósea y tejidos linfoides. CLL tiene una incidencia de 2.7 casos por cada 100,000 en los Estados Unidos. El riesgo aumenta progresivamente con la edad, especialmente en los hombres. Representa el 0.8% de todos los cánceres y es la leucemia adulta más común, responsable del 30% de todas las leucemias. En casi todos los casos (> 98%) las células enfermas pertenecen al linaje de linfocitos B. Una variante no leucémica, linfoma linfocítico pequeño, constituye el 5-10% de todos los linfomas, tiene características histológicas, morfológicas e inmunológicas indistinguibles de aquella de ganglios linfáticos implicados en pacientes con B-CLL (Williams, 2001).

La historia natural de la leucemia linfocítica crónica se divide en varias fases. En la primera fase, la leucemia linfocítica crónica es una enfermedad indolente, caracterizada por la acumulación de células B malignas, pequeñas, maduras, funcionalmente incompetentes que tienen una vida útil alargada. Eventualmente, el tiempo de duplicación de las células B malignas disminuye y los pacientes se vuelven cada vez más sintomáticos. Mientras que el tratamiento con agentes quimioterapéuticos puede proporcionar alivio sintomático, la supervivencia global de los pacientes es sólo mínimamente extendida. Las últimas etapas de la leucemia linfocítica crónica se caracterizan por anemia y/o trombocitopenia significativa. En este punto, la supervivencia media es de menos de dos años (Foon y otros, 1990, *Annals Int. Medicine* 113:525). Debido a la muy baja velocidad de proliferación celular, la leucemia linfocítica crónica es resistente al tratamiento con agentes quimioterapéuticos.

Recientemente, estudios de expresión génica han identificado varios genes que se pueden regular hasta en los trastornos linfoproliferativos. Una molécula que se pensó que se sobre expresa en pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y en una gran fracción de pacientes de linfoma no Hodgkin es CD32B (Alizadeh y otros, 2000, *Nature* 403:503-511; Rosenwald y otros, 2001, *J. Exp. Med* 184:1639-1647). Sin embargo, el papel de CD32B en B-CLL no está claro ya que un reporte demuestra que CD32B se expresó en un porcentaje bajo de células B-CLL y en una densidad baja (Damle y otros, 2002, *Blood* 99:4087-4093). CD32B es un antígeno de superficie del linaje de células B, cuya sobre-expresión en la neoplasia de células B lo convierte en un objetivo adecuado para los anticuerpos terapéuticos. Adicionalmente, CD32B pertenece a la categoría de receptores inhibidores, cuya ligadura entrega una señal negativa. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos contra CD32B pueden funcionar para eliminar las células tumorales por mecanismos que incluyen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), sino además desencadenan una señal apoptótica. La alta homología de CD32B con su contraparte, CD32A, un receptor Fc de activación, hasta el momento ha dificultado la generación de anticuerpos que selectivamente reconocen uno pero no la otra forma de la molécula.

3.2.1.2 Terapia contra el Cáncer

En la actualidad, la terapia contra el cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para destruir las células neoplásicas en un paciente (Ver, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein y Federman, editores, Capítulo 12, Sección IV). La terapia del cáncer puede además implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todos estos enfoques plantean inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, se puede contraindicar debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Además, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La radioterapia es eficaz solamente cuando el tejido neoplásico exhibe una mayor sensibilidad a la radiación que los tejidos normales, y la radioterapia puede provocar además efectos secundarios frecuentemente graves. La terapia hormonal se da raramente como un agente único y, aunque puede ser eficaz por sí sola, se usa frecuentemente para impedir o retrasar la recurrencia de cáncer después de que otros tratamientos han eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias se limitan en número y pueden producir efectos secundarios tales como erupciones o inflamaciones, síntomas parecidos a la gripe, que incluyen fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo o reacciones alérgicas.

Con respecto a la quimioterapia, existen una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento de cáncer. Una mayoría significativa de agentes quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, ya sea directamente, o indirectamente inhibiendo la biosíntesis de los precursores de desoxirribonucleótido trifosfato, para impedir la replicación del ADN y la división celular concomitante (Ver, por ejemplo, Gilman y otros, *Goodman y Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Eighth Edición (Pergamom Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, anti-metabolitos, tales como metotrexato e hidroxurea, y otros agentes, tales como etopósidos, campotecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorubicina, etc., aunque no son necesariamente específicos al ciclo celular, destruyen células durante la fase S debido a su efecto sobre la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente colchicina y los alcaloides vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el ensamblaje de microtúbulos resultando en la detención mitótica. Generalmente los protocolos de quimioterapia implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para aumentar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos, la quimioterapia tiene muchos inconvenientes (Ver, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein y Federman, editores, ch. 12, sect. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia causa efectos secundarios significativos, y frecuentemente peligrosos, que incluyen náusea

5 severa, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. Además, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, las células resistentes a los agentes quimioterapéuticos particulares usados en el protocolo de tratamiento frecuentemente resultan 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 pleiotrópica del fármaco o múltiples fármacos. Así, debido a la resistencia a los fármacos, muchos cánceres resultan refractarios a los protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

10 La malignidad de células B se trata generalmente con quimioterapia de agente único, quimioterapia de combinación y/o radioterapia. Estos tratamientos pueden reducir la morbilidad y/o mejorar la supervivencia, aunque portan efectos secundarios significativos. La respuesta de las malignidades de células B a diversas formas de tratamiento se mezcla. Por ejemplo, en los casos en que es posible la presentación clínica adecuada de los linfomas no Hodgkin, la radioterapia de campo puede proporcionar tratamiento satisfactorio. Ciertos pacientes, sin embargo, no pueden responder y la recurrencia de la enfermedad con resistencia al tratamiento sucede con el tiempo, particularmente con las variantes más agresivas de la enfermedad. Cerca de la mitad de los pacientes mueren a causa de la enfermedad (Devesa y otros, 1987, J. Nat'l Cancer Inst. 79:701).

15 Terapias en investigación para el tratamiento de la neoplasia refractaria de células B incluyen trasplante autólogo y alogénico de células madre o médula ósea y terapias génicas. Recientemente, la inmunoterapia usando anticuerpos monoclonales para los antígenos específicos de células B objetivo se ha introducido en el tratamiento de la neoplasia de células B. El uso de anticuerpos monoclonales con radionúclidos directos, toxinas, u otros agentes terapéuticos ofrece la posibilidad de que tales agentes se pueden entregar selectivamente a los sitios tumorales, limitando así la toxicidad a los tejidos normales.

25 Existe una necesidad significativa de tratamientos alternativos para el cáncer, particularmente para el tratamiento del cáncer que ha demostrado ser refractario a los tratamientos estándar contra el cáncer, tal como la cirugía, radioterapia, quimioterapia, y terapia hormonal. Una alternativa prometedora es la inmunoterapia, en los que las células cancerosas se dirigen específicamente por anticuerpos específicos a antígeno de cáncer. Los esfuerzos principales se han dirigido a aprovechar la especificidad de la respuesta inmunológica, por ejemplo, la tecnología de hibridomas ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos al tumor (Ver Green M.C. y otros, 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(suppl. 14):43-51) y en el últimos años, la Administración de Alimentos y Medicamentos ha aprobado los primeros MAbs para la terapia contra el cáncer: Rituxin (anti-CD20) para el linfoma no Hodgkin, Campath (anti-CD52) para leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y Herceptin [anti-(c-erb-2/HER-2)] para el cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res. 3: 86-90). Sin embargo, la potencia de la función efectora de los anticuerpos, *por ejemplo*, para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ("ADCC") es un obstáculo para tal tratamiento. Además, con Rituxan y Campath, al menos la mitad de los pacientes no pueden responder y una fracción de respondedores pueden ser refractarios a los tratamientos posteriores. Se necesitan así métodos para mejorar la eficacia de tal tratamiento.

40 Existe una necesidad de terapias alternativas para el cáncer, particularmente, malignidades de células B, especialmente para pacientes que son refractarios a tratamientos estándar contra el cáncer y nuevas inmunoterapias tales como Rituxan.

45 3.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes

La inflamación es un proceso por el cual los glóbulos blancos del cuerpo y sustancias químicas protegen nuestro cuerpo de la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Por lo general se caracteriza por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento de la zona afectada. Las sustancias químicas conocidas como citoquinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada auto-limitante y ordenada en la sangre o tejidos afectados. Esta liberación de sustancias químicas aumenta el flujo de sangre al área de lesión o infección, y puede resultar en enrojecimiento y calor. Algunas de las sustancias químicas causan una fuga de líquido en los tejidos, resultando en la inflamación. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un período limitado en el área relevante, trabajan para el beneficio del cuerpo.

55 En los trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, el sistema inmunológico desencadena una respuesta inflamatoria cuando no existen sustancias extrañas para combatir y normalmente el sistema inmunológico protector del cuerpo causa daño a sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se afecta en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se afecta en individuos con enfermedad de Crohn y la membrana sinovial, hueso y cartílago de diversas articulaciones se afectan en individuos con artritis reumatoide. Como progresan los trastornos autoinmunitarios, pueden resultar destrucción de uno o más tipos de tejidos del cuerpo, crecimiento anormal de un órgano, o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar a un solo órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen las células rojas de la sangre, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (*por ejemplo*, la tiroides o páncreas), músculos, articulaciones, y piel. Ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitarse a,

tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de oído interior, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerativa.

5 La artritis reumatoide (RA) y artritis reumatoide juvenil son tipos de artritis inflamatoria. La artritis es un término general que describe la inflamación en las articulaciones. Algunos, pero no todos, los tipos de artritis son el resultado de la inflamación mal dirigida. Además de la artritis reumatoide, otros tipos de artritis asociada con la 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 ocurre en las 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 ocasionalmente afectar la piel, ojos, pulmones, corazón, sangre o nervios.

10 La artritis reumatoide afecta aproximadamente 1% de la población mundial y es potencialmente incapacitante. Existen aproximadamente 2.9 millones de incidencias de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Se afectan de dos a tres veces más mujeres que hombres. La edad típica que ocurre la artritis reumatoide es entre 25 y 50 años. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71,000 jóvenes norteamericanos (de dieciocho años y menores), afectando seis veces más a las chicas que a los chicos.

15 La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria donde el sistema inmunológico del cuerpo identifica inadecuadamente las membranas sinoviales que secretan el líquido lubricante en las articulaciones como extraño. La inflamación resulta, y el cartílago y tejidos dentro y alrededor de las articulaciones se dañan o destruyen. En casos severos, esta inflamación se extiende al cartílago circundante y otros tejidos de la articulación, donde se puede erosionar o destruir el hueso y cartílago y conducir a deformidades de la articulación. El cuerpo sustituye el tejido dañado por tejido cicatrizal, que causan estrecharse los espacios normales dentro de las articulaciones y fusionar conjuntamente los huesos. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchamiento, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre, y con frecuencia, dolor paralizante. Algunos de los síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez en las articulaciones al despertar que dura una hora o más; hinchamiento en las articulaciones de un dedo específico o muñeca; hinchamiento de los tejidos blandos alrededor de las articulaciones; e hinchamiento en ambos lados de la articulación. El hinchamiento puede ocurrir con o sin dolor, y puede empeorar de forma progresiva o permanecer igual durante años antes de progresar.

20 El diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, que incluyen: la localización específica y la simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez de las articulaciones en la mañana, la presencia de protuberancias y nódulos debajo de la piel (nódulos reumatoides), resultados de pruebas de rayos X que sugieren la artritis reumatoide, y/o los resultados positivos de una prueba de sangre llamada factor reumatoide. Muchos, pero no todas, las personas con artritis reumatoide tienen el anticuerpo del factor reumatoide en su sangre. El factor reumatoide puede estar presente en las personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades pueden causar además que se produzca en la sangre el factor reumatoide. Es por eso que el diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no sólo la presencia del factor reumatoide en la sangre.

25 El curso típico de la enfermedad es uno de los síntomas articulares persistentes pero fluctuantes, y después de aproximadamente 10 años, 90% de los enfermos mostrarán daños estructurales al hueso y cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una corta enfermedad que desaparece por completo, y otro porcentaje pequeño tendrá enfermedad muy severa con muchas deformidades de las articulaciones, y ocasionalmente otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio causa erosión o destrucción del hueso y cartílago en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmunitario de presentación persistente del antígeno, estimulación de las células T, secreción de citoquinas, activación de las células sinoviales, y destrucción de la articulación. La enfermedad tiene un gran impacto tanto en el individuo como la sociedad, causando dolor significativo, deterioro de la función y discapacidad, así como costando millones de dólares en gastos de atención médica y pérdidas salariales (ver, por ejemplo el sitio web NIH y el sitio web de NIAID).

30 La terapia actualmente disponible para la artritis se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicamentos antiinflamatorios o inmunosupresores: La primera línea de tratamiento de cualquier artritis es usualmente antiinflamatorios, tal como aspirina, ibuprofeno e inhibidores Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los "fármacos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos son tratamientos bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten con solo 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 para citocinas o receptores recombinantes solubles. Por ejemplo, los receptores recombinantes solubles y anticuerpos monoclonales para el factor de necrosis tumoral (TNF)- α se han usado en combinación con metotrexato en el tratamiento de la artritis. Sin embargo, solamente aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- α tales como receptores recombinantes solubles para TNF- α muestran una mejoría clínicamente significativa. Muchos pacientes siguen siendo refractarios a pesar del tratamiento. Aún quedan asuntos de tratamiento difíciles para los pacientes con artritis reumatoide. Muchos de los tratamientos actuales tienen

una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden impedir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, ningún tratamiento es ideal, y no existe cura. Nuevas terapias se necesitan que traten más eficazmente la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunitarios.

5 3.2.3 Alergia

10 Las reacciones alérgicas mediadas por el sistema inmunológico (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 la IgE de sustancias vasoactivas, tales como la histamina de los mastocitos y basófilos. La liberación de estas sustancias y la posterior manifestación de síntomas alérgicos se inician por la reticulación de la IgE unida al alérgeno con su receptor en la superficie de los mastocitos y basófilos. En individuos que sufren de reacciones alérgicas de tipo I, la exposición a un alérgeno por una segunda vez conduce a la producción de altos niveles de anticuerpos de IgE específicos para el alérgeno como un resultado de la participación de las células B y T de memoria en la interacción de 3 células requeridas para la producción de IgE. Los altos niveles de anticuerpos IgE producidos causan un aumento en la reticulación de los receptores de IgE en los mastocitos y basófilos por la IgE unida al alérgeno, lo que a su vez conduce a la activación de estas células y la liberación de mediadores farmacológicos que son responsables de las manifestaciones clínicas de las enfermedades alérgicas de tipo I.

20 Dos receptores con diferentes afinidades para IgE se han identificado y caracterizado. El receptor de alta afinidad (FcεRI) se expresa en la superficie de los mastocitos y basófilos. El receptor de baja afinidad (FcεRII/CD23) se expresa en muchos tipos de células, que incluyen las células B, células T, macrófagos, eosinófilos y células de Langerhans. El receptor IgE de alta afinidad consiste de tres subunidades (cadenas alfa, beta y gamma). Varios estudios demuestran que solamente la cadena alfa está implicada en la unión de la IgE, mientras que se requieren las cadenas beta y gamma (que son ya sea proteínas transmembrana o citoplasmáticas) para los eventos de transducción de la señal. La identificación de las estructuras IgE requeridas para que IgE se una a FcεRI en los mastocitos y basófilos es de suma importancia en la elaboración de estrategias para el tratamiento o prevención de alergias mediadas por IgE. Por ejemplo, el esclarecimiento del sitio de unión al receptor de IgE puede conducir a la identificación de los péptidos o pequeñas moléculas que bloquean la unión de IgE a las células que portan los receptores *in vivo*.

30 Actualmente, las reacciones alérgicas mediadas por IgE se tratan con fármacos tales como antihistamínicos y corticosteroides que intentan aliviar los síntomas asociados con las reacciones alérgicas contrarrestando los efectos de las sustancias vasoactivas liberadas a partir de mastocitos y basófilos. Las dosis altas de corticosteroides y antihistamínicos tienen efectos secundarios perjudiciales (*por ejemplo*, alteración del sistema nervioso central, estreñimiento, *etc*). Así, se necesitan otros métodos para tratar reacciones alérgicas de tipo I.

40 Un enfoque para el tratamiento de los trastornos alérgicos de tipo I ha sido la producción de anticuerpos monoclonales que reaccionan con la IgE soluble (libre) en el suero, bloquean la IgE a partir de la unión a su receptor en los mastocitos y basófilos, y no se unen a la IgE unida al receptor (*es decir*, no son anafilactogénicos). Dos de tales anticuerpos monoclonales están en etapas avanzadas de desarrollo clínico para el tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE (*ver, por ejemplo*, Chang, T.W., 2000, Nat. Biotech. 18:157-162).

45 Uno de los tratamientos más prometedores para las reacciones alérgicas mediadas por IgE es la inmunización activa contra los epítopos adecuados no anafilactogénicos sobre la IgE endógena. Stanworth y otros (la patente de Estados Unidos núm. 5,601,821) describe una estrategia que implica el uso de un péptido derivado del dominio CεH4 de la IgE humana acoplada a una proteína portadora heteróloga como una vacuna para la alergia. Sin embargo, este péptido ha demostrado no inducir la producción de anticuerpos que reaccionan con la IgE soluble nativa. Además, Hellman (la patente de Estados Unidos núm. 5,653,980) propuso composiciones de la vacuna anti-IgE basado en la fusión de los dominios completos CεH2-CεH3 (aproximadamente 220 aminoácidos de largo) a una proteína transportadora extraña. Sin embargo, los anticuerpos inducidos por las composiciones de la vacuna anti-IgE propuestos en Hellman más probablemente resultarán en la anafilaxia ya que los anticuerpos contra algunas porciones de los dominios CεH2 y CεH3 de la molécula IgE han demostrado reticular con el receptor de IgE en la superficie de los mastocitos y basófilos y conducen a la producción de mediadores de la anafilaxia (*Ver, por ejemplo*, Stadler y otros, 1993, Int. Arch. Allergy and Immunology 102:121-126). Por lo tanto, continúa una necesidad de tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE que no induzcan anticuerpos anafilácticos.

60 La preocupación significativa sobre la inducción de la anafilaxia ha resultado en el desarrollo de otro enfoque para el tratamiento de trastornos alérgicos de tipo I consistente de mimotopos que pueden inducir la producción de anticuerpos policlonales anti-IgE cuando se administran a animales (*Ver, por ejemplo*, Rudolf, y otros, 1998, Journal of Immunology 160:3315-3321). Kricek y otros (publicación internacional núm. WO 97/31948), tamizaron las bibliotecas de presentación de péptidos en fagos con el anticuerpo monoclonal BSW17 para identificar mimotopos peptídicos que pueden imitar la conformación de la unión al receptor de IgE. Estos mimotopos presumiblemente se pueden usar para inducir anticuerpos policlonales que reaccionan con la IgE nativa libre, pero no con la IgE unida al receptor, así como bloquear la unión de IgE a su receptor. Kriek y otros describen mimotopos peptídicos que no son homólogos con ninguna parte de la molécula de IgE y son así diferentes de los péptidos descritos en la presente invención.

Como se evidencia por un estudio de la técnica, continúa habiendo una necesidad para mejorar la eficacia terapéutica de los métodos actuales para tratar o impedir trastornos tales como cáncer, enfermedad autoinmunitaria, trastorno inflamatorio, o alergia. Particularmente, existe una necesidad para mejorar la función efectora, particularmente, el efecto citotóxico de anticuerpos terapéuticos usados en el tratamiento del cáncer. El estado actual de la técnica es deficiente además para tratar o impedir trastornos alérgicos (*por ejemplo*, ya sea por terapia con anticuerpos o terapia con vacuna).

4. Resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región Fc humana y un dominio variable, en donde dicho anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB a través de dicho dominio variable, en donde dicho dominio variable comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 68 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 62, o un fragmento de dicho anticuerpo que comprende dicho dominio variable y se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano a través de dicho dominio variable. Los anticuerpos humanizados de FcγRIIB, un anticuerpo aislado o un fragmento de este, de la invención se puede unir específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, más particularmente FcγRIIA humano nativo. Como se usa en la presente, "FcγRIIB o FcγRIIA nativo" significa FcγRIIB o FcγRIIA que se expresa de forma endógena en una célula y está presente en la superficie celular de esa célula o se expresa de forma recombinante en una célula de mamífero y está presente en la superficie celular, pero no se expresa FcγRIIB o FcγRIIA en una célula bacteriana o FcγRIIB o FcγRIIB aislado, desnaturalizado. Se describen en la presente anticuerpos humanizados, y fragmentos de unión a antígeno de estos, derivados de anticuerpos que se unen a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, más particularmente FcγRIIA humano nativo. Se describen en la presente los anticuerpos humanizados 2B6 o 3H7 o fragmentos de estos, particularmente fragmentos de unión al antígeno de estos. Se describen además en la presente los anticuerpos humanizados 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 y fragmentos de estos, particularmente fragmentos de unión a antígeno de estos.

Preferentemente los anticuerpos humanizados de la invención se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. Los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados descritos en la presente pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de una CDR1 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:29, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una CDR2 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:2, sec. con núm. de ident.:30, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una CDR3 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:3, sec. con núm. de ident.:31, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 99-110 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 99-110 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de una CDR1 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:8, sec. con núm. de ident.:38, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 24-34 como se expone en la sec. con núm. de ident.:62) y/o a CDR2 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:9, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:11, sec. con núm. de ident.:39, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-56 como se expone en la sec. con núm. de ident.:62) y/o una CDR3 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:12, sec. con núm. de ident.:40, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 89-97 como se expone en la sec. con núm. de ident.:62).

Los anticuerpos humanizados descritos en la presente pueden comprender una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.:20, sec. con núm. de ident.:22, sec. con núm. de ident.:46, o sec. con núm. de ident.:62, y/o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.:24, sec. con núm. de ident.:37, sec. con núm. de ident.:60, o sec. con núm. de ident.:68 y/o variantes de secuencia de aminoácidos de estas. Los anticuerpos humanizados de la invención comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.:62 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.:68.

En particular, se describe en la presente un anticuerpo humanizado que se une inmuno-específicamente al dominio extracelular del FcγRIIB humano nativo, dicho anticuerpo que comprende (o alternativamente, consistente de) una VH CDR1 y una VL CDR1; una VH CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2 y una VL CDR1; una VH CDR2 y una VL CDR2; una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR3 y una VH CDR1; una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR3 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR1; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR1, una VH CDR2,

una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR1; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; o cualquier combinación de éstas de las VH CDR y VL CDR descritas en la presente.

Se describe en la presente un anticuerpo 2B6 humanizado, en donde la región VH consiste de los segmentos FR del segmento VH1-18 y JH6 de VH de la línea germinal humana, y las regiones CDR de 2B6 VH con la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo humanizado 2B6 en donde la región VH comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 60. La invención proporciona un anticuerpo humanizado 2B6 en donde una región VH comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 68. Se describe en la presente un anticuerpo humanizado 2B6 en donde la región VL consiste de los segmentos FR del segmento VK-A26 y JK4 de VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de 2B6 VL, con una secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 20, o sec. con núm. de ident.: 22. La invención proporciona un anticuerpo humanizado 2B6 en donde la región VL comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 62.

Se describe en la presente un anticuerpo humanizado 3H7, en donde una región VH consiste de los segmentos FR a partir de un segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7 VH, con la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.: 37. En otro caso, el anticuerpo humanizado 3H7 comprende además una región VL, que consiste en los segmentos de FR del segmento VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7 VL, con una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 46.

Se describen en la presente moléculas de anticuerpo humanizado específicas para FcγRIIB en la que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) se han sustituido por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donador que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que a FcγRIIA, por ejemplo, del anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7 que se unen a FcγRIIB, con número de acceso ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, o un anticuerpo monoclonal producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, con números de acceso ATCC PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. En el caso más preferido, el anticuerpo humanizado se puede específicamente unir al mismo epítipo como el anticuerpo murino donador. Se apreciará por una persona con experiencia en la técnica que la descripción abarca generalmente el injerto de CDR de anticuerpos. Así, los anticuerpos donador y aceptor se pueden derivar de animales de la misma especie y aun la misma clase o subclase de anticuerpos. Más generalmente, sin embargo, los anticuerpos donador y receptor se derivan de animales de especies diferentes. Típicamente el anticuerpo donador es un anticuerpo no humano, tal como un MAb de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunos casos, al menos una CDR del anticuerpo donador se injerta en el anticuerpo humano. En otros casos, al menos dos y preferentemente todas las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDRs del bucle estructural ("CDRs Chothia") o una combinación de estas. En algunos casos, la descripción abarca un anticuerpo FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada injertada con CDR y al menos una cadena ligera injertada con CDR.

En un caso preferido, las regiones CDR del anticuerpo humanizado específico a FcγRIIB se derivan de un anticuerpo murino contra FcγRIIB. En algunos casos, los anticuerpos humanizados descritos en la presente comprenden alteraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, deleciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, *es decir*, regiones marco del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera que son necesarias para retener y/o alterar y/o mejorar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. Tales modificaciones pueden modificar la secuencia de aminoácido de la región marco que corresponde con la región marco del donador, *por ejemplo* anticuerpo murino. La invención abarca un anticuerpo humanizado con fenilalanina en el aminoácido número 21 de la región 1 marco del dominio variable de la cadena ligera (correspondiente con el aminoácido número 21 de sec. con núm. de ident.: 62). Se describe en la presente un anticuerpo humanizado con una o más de una isoleucina en el aminoácido número 13 de la región 2 marco del dominio variable de la cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 48 de sec. con núm. de ident.: 60), una valina en el aminoácido número 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 72 de sec. con núm. de ident.: 60), una valina en el aminoácido número 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*,

correspondiente al aminoácido número 73 de sec. con núm. de ident.:60), una valina en el aminoácido número 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 74 de sec. con núm. de ident.:60), o cualquier combinación de éstos. La invención abarca un anticuerpo humanizado con una o más de una isoleucina en el aminoácido número 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente con el aminoácido número 48 de sec. con núm. de ident.:68), una valina en el aminoácido número 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 72 de sec. con núm. de ident.:68), un ácido aspártico en el aminoácido número 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 73 de sec. con núm. de ident.:68), una treonina en el aminoácido número 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 74 de sec. con núm. de ident.:68), o cualquier combinación de éstos. En algunos casos, los anticuerpos humanizados comprenden al menos una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, inserción, deleción, sustitución) en una o más de las regiones marco del dominio variable de la cadena ligera. En ciertas modalidades, la invención abarca un anticuerpo humanizado que comprende una modificación en el aminoácido 21 de la región 1 marco del dominio variable de la cadena ligera (correspondiente al aminoácido número 21 en la sec. con núm. de ident.: 62) cuya modificación es preferentemente una sustitución con fenilalanina. En otros casos, los anticuerpos humanizados comprenden al menos una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, inserción, deleción, sustitución) en una o más de las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada. En ciertas modalidades, la invención abarca un anticuerpo humanizado que comprende una modificación en el aminoácido 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con isoleucina (correspondiente al aminoácido número 48 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con valina (correspondiente al aminoácido número 72 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con ácido aspártico (correspondiente al aminoácido número 73 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con treonina (correspondiente al aminoácido número 74 en la sec. con núm. de ident.:68). En otro caso un anticuerpo humanizado se describe en la presente que comprende una modificación en el aminoácido 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con isoleucina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 48 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con valina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 72 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con valina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 73 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es preferentemente una sustitución con valina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 74 en la sec. con núm. de ident.:60). Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de dominios variables de cadena pesada y cadena ligera de 2B6 humanizado se exponen en la Figura 2A y la Figura 2B, respectivamente. Se describe en la presente cualquier combinación de las modificaciones anteriores de aminoácidos y las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada y o ligera. En algunos casos, las regiones marco de los anticuerpos humanizados descritos en la presente no necesariamente consisten de la secuencia de aminoácidos precisa de la región marco de una región variable del anticuerpo humano de origen natural, pero contienen varias alteraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejora de las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica para el mismo objetivo que el anticuerpo murino específico a FcγRIIB. En los casos más preferidos, un número mínimo de alteraciones se hacen a la región marco para evitar introducciones a gran escala de residuos del marco no humano y para asegurar inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los humanos. En algunos casos, los residuos del marco se derivan del segmento VH1-18 y JH6 de VH de la línea germinal humana y/o el segmento VK-A26 y JK4 de VL de la línea germinal humana. En algunos casos, no existen alteraciones hechas en las regiones marco. En modalidades específicas, el anticuerpo monoclonal donador de la presente invención es un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 que se une a FcγRIIB, con el número de acceso ATCC PTA-4591.

Los anticuerpos humanizados de la presente invención incluyen moléculas de anticuerpo completas con las cadenas pesadas y ligeras completas, o cualquier fragmento de estas, tales como los fragmentos Fab o (Fab')₂, un dímero de cadena pesada y cadena ligera, o cualquier fragmento mínimo de este tal como un Fv, un SCA (anticuerpo de cadena sencilla), que exhibe unión inmunespecífica para el FcγRIIB.

En ciertas modalidades, la región Fc comprende al menos una modificación de aminoácido respecto a una región Fc silvestre, tal que la región Fc modificada tiene una afinidad de unión alterada para un receptor de Fc. En una modalidad específica, la modificación de aminoácido de las regiones Fc de los anticuerpos humanizados de la invención respecto a la región Fc silvestre comprende una sustitución en la posición 243, 292, 300, 305 y 396. En una cierta modalidad, la modificación de aminoácido de las regiones Fc de los anticuerpos humanizados de la invención respecto a una región Fc silvestre comprende una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina. En otras modalidades, el dominio Fc del anticuerpo o fragmento de este tiene una afinidad de unión aumentada a FcγRIIB y/o FcγRIII respecto a la del anticuerpo silvestre.

En una modalidad específica, la región Fc del anticuerpo humanizado de la invención comprende una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305 y una leucina en la posición 396.

5 En una modalidad específica, un anticuerpo humanizado 2B6 de la invención comprende una cadena pesada con la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.:64. En otra modalidad específica, el anticuerpo humanizado 2B6 de la invención comprende una cadena pesada con la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.:70. En aún otras modalidades, el anticuerpo humanizado 2B6 comprende una cadena ligera con la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.:66. En una modalidad preferida, el anticuerpo humanizado 2B6 de la invención comprende una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 70 y una cadena ligera que contiene la sec. con núm. de ident.:66. En un aspecto específico de la invención, el plásmido pMGx0675 comprende las secuencias de nucleótidos sec. con núm. de ident.:69 y sec. con núm. de ident.:65 que codifican la secuencia de aminoácido de la cadena pesada sec. con núm. de ident.:70 y la secuencia de aminoácido de la cadena ligera sec. con núm. de ident.:66, respectivamente. El plásmido pMGx0675 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 Universidad Blvd., Manassas, Virginia. 20110-2209) el 23 de Mayo, 2006 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimientos de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-7609.

20 En una modalidad particular, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB a través del dominio variable con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA, y el dominio constante de dicho anticuerpo tiene además una afinidad mejorada para al menos uno o más receptores de activación de Fc con respecto a un anticuerpo de control de isotipo. Todavía en otra forma de modalidad específica, dicho receptor de activación de Fc es FcγRIIIA o FcγRIIA.

25 Se describen en la presente métodos para la producción de anticuerpos de la invención o fragmentos de estos, particularmente para la producción de anticuerpos humanizados específicos anti-FcγRIIB, tal que los anticuerpos específicos a FcγRIIB tienen una especificidad mejorada para FcγRIIB respecto a FcγRIIA. La descripción abarca cualquier método conocido en la técnica útil para la producción de polipéptidos, *por ejemplo*, síntesis *in vitro*, producción de ADN recombinante. Preferentemente, los anticuerpos humanizados se producen por la tecnología de ADN recombinante. Los anticuerpos humanizados específicos a FcγRIIB de la invención se pueden producir usando tecnología para la expresión de inmunoglobulinas recombinantes. Métodos ilustrativos para la producción de anticuerpos humanizados recombinantes de la invención pueden comprender lo siguiente: a) construir, por métodos convencionales de biología molecular, un vector de expresión que comprende un operón que codifica una cadena pesada de anticuerpo en la que se requieren las CDR y una porción mínima del marco de la región variable para mantener la especificidad de unión del anticuerpo donador que se derivan de una inmunoglobulina no humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino específico a FcγRIIB, *por ejemplo*, el anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7 que se une a FcγRIIB, con números de accesos ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, o el anticuerpo monoclonal producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 con números de accesos ATCC PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, y el resto del anticuerpo se deriva de una inmunoglobulina humana, produciendo de ese modo un vector para la expresión de una cadena pesada de anticuerpo humanizado, *por ejemplo*, el plásmido pMGx0675 que comprende la secuencia de ácido nucleico sec. con núm. de ident.:69 que codifica la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 70, dicho plásmido con el número de acceso ATCC PTA-7609, depositado el 23 de mayo de 2006; b) construir, por métodos convencionales de biología molecular, un vector de expresión que comprende un operón que codifica una cadena ligera de anticuerpo en la que se requiere las CDR y una porción mínima del marco de la región variable para mantener la especificidad de unión del anticuerpo donador que se derivan de la inmunoglobulina no-humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino de FcγRIIB, *por ejemplo*, el anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7 que se une a FcγRIIB, con números de acceso ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente, o el anticuerpo monoclonal producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 con número de acceso ATCC PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente, y el resto del anticuerpo se deriva de una inmunoglobulina humana, produciendo de ese modo un vector para la expresión de la cadena ligera del anticuerpo humanizado, *por ejemplo*, el plásmido pMGx0675 que comprende la secuencia de ácido nucleico sec. con núm. de ident.: 65 que codifica la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 66, dicho plásmido con el número de acceso ATCC PTA-7609, depositado el 23 de mayo de 2006; c) transferir los vectores de expresión a una célula huésped por métodos convencionales de biología molecular para producir una célula huésped transfectada para la expresión de anticuerpos humanizados anti- FcγRIIB; d) cultivar la célula transfectada por técnicas convencionales de cultivo celular para producir anticuerpos humanizados anti- FcγRIIB; y e) recuperar los anticuerpos anti-FcγRIIB del cultivo por medios convencionales. Las células huésped se pueden cotransfectar con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector contiene un operón que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo que contiene un operón que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables diferentes pero, son preferentemente idénticos, con la excepción de las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera. Este procedimiento prevé la expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un solo vector se pueden usar, que codifica tanto los polipéptidos de cadena pesada como ligera *por ejemplo*, el plásmido pMGx0675, con número de acceso ATCC PTA-7609, depositado el 23 de mayo 2006 que comprende las secuencias de ácido nucleico sec. con núm. de ident.: 69 y sec. con núm. de ident.: 65 que codifican

5 las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humanizado 2B6 (*es decir*, sec. con núm. de ident.:70 y sec. con núm. de ident.:66, respectivamente). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico o ambos. La célula huésped usada para expresar el anticuerpo recombinante de la invención puede ser ya sea una célula bacteriana tal como *Escherichia coli*, o, preferentemente, una célula eucariota. Preferentemente, se puede usar una célula de mamífero tal como una célula de ovario de hámster chino o HEK-293. La elección del vector de expresión depende de la elección de la célula huésped, y se puede seleccionar para tener las características de expresión y regulación deseadas en la célula huésped seleccionada. Los métodos generales para la construcción del vector de la invención, la transfección de las células para producir la célula huésped de la invención, cultivo de células para producir el anticuerpo de la invención son todos métodos convencionales de biología molecular. Del mismo modo, una vez producidos, los anticuerpos recombinantes de la invención se pueden purificar por procedimientos estándar de la técnica, que incluyen la filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad por columna, electroforesis en gel y similares.

15 En algunos casos, los métodos de fusión celular para preparar anticuerpos monoclonales se pueden usar en los métodos de la invención, tales como aquellos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 5,916,771. En resumen, de acuerdo con este método, el ADN que codifica la cadena pesada deseada (o un fragmento de la cadena pesada) se introduce en la primera célula huésped de mamífero, mientras que el ADN que codifica la cadena ligera deseada (o un fragmento de la cadena ligera) se introduce en la segunda célula huésped de mamífero. La primera célula huésped transformada y la segunda célula huésped transformada se combinan después por fusión celular para formar una tercera célula. Antes de la fusión de la primera y segunda células, las células transformadas se pueden seleccionar para las características deseadas específicamente, *por ejemplo*, altos niveles de expresión. Después de la fusión, la célula híbrida resultante contiene y expresa tanto el ADN que codifica la cadena pesada deseada como el DNA que codifica la cadena ligera deseada, resultando en la producción del anticuerpo multimérico.

25 La invención abarca el uso de los anticuerpos humanizados de la presente invención junto con, o unido a, otros anticuerpos o fragmentos de estos, tales como anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Estos otros anticuerpos pueden ser reactivos con otros marcadores (epítomos) característicos de la enfermedad contra la que los anticuerpos de la invención se dirigen o puede tener diferentes especificidades elegidas, por ejemplo, reclutar moléculas o células del sistema inmunológico humano a las células enfermas. Los anticuerpos de la invención (o partes de estos) se pueden administrar con dichos anticuerpos (o partes de estos) como composiciones administradas por separado o como una sola composición con los dos agentes unidos por métodos biológicos moleculares o química convencional. Además, el valor diagnóstico y terapéutico de los anticuerpos de la invención se puede aumentar marcando los anticuerpos humanizados con marcadores que producen una señal detectable (ya sea *in vitro* o *in vivo*) o con un marcador que tiene una propiedad terapéutica. Algunos marcadores, *por ejemplo*, radionúclidos pueden producir una señal detectable y tener una propiedad terapéutica. Los ejemplos de marcadores radionúclidos incluyen I¹²⁵, I¹³¹, C¹⁴. Los ejemplos de otros marcadores detectables incluyen un cromóforo fluorescente tal como fluoresceína, ficobiliproteína o tetraetilo de rodamina para microscopía de fluorescencia; una enzima que produce una fluorescencia o producto coloreado para la detección por fluorescencia, absorbancia, color visible o aglutinación, o que produce un producto denso de electrones para la demostración por microscopía electrónica; o una molécula densa de electrones tal como la ferritina, peroxidasa o perlas de oro para la visualización microscópica de electrones directa o indirecta. Los marcadores que tienen propiedades terapéuticas incluyen los fármacos para el tratamiento de cáncer, como el metotrexato.

45 Los métodos de la invención abarcan polinucleótidos además que codifican los anticuerpos humanizados de la invención o fragmentos de estos. En una modalidad, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada y/o el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo de la invención. En un caso específico un ácido nucleico aislado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:60. El ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:60, puede por ejemplo, comprender la secuencia de nucleótidos sec. con núm. de ident.:59. En una modalidad específica, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:68. De acuerdo con esta modalidad, el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de cadena pesada, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:68, puede, por ejemplo, comprender la secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.:67. En aún otras modalidades, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:62. De acuerdo con estas modalidades, el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena ligera, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:62, puede, por ejemplo, comprender la secuencia de nucleótidos sec. con núm. de ident.:61. En aún otras modalidades, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de este de la invención que específicamente se une a FcγRIIB con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA. En otra modalidad, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB y bloquea el dominio de unión a Fc de FcγRIIB. Se describe además en la presente, un vector que comprenden dicho ácido nucleico. El vector puede

comprender una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera, siendo dicha cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA. El vector puede ser un vector de expresión. Se describen en la presente células huésped que contienen los vectores o secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, las secuencias de nucleótidos pueden codificar las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos producidos por los clones de hibridoma depositados con números de acceso ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, o porciones y/o variantes/derivados de estos (*por ejemplo*, CDRs, dominios variables, *etc.* y versiones humanizadas de estos). En un caso específico se describe en la presente la secuencia de nucleótidos sec. con núm. de ident.:63, que codifica una cadena pesada de h2B6, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:64. En otro caso específico, se describe en la presente la secuencia de nucleótidos sec. con núm. de ident.:69, que codifica una cadena pesada de h2B6, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:70. En aún otro caso específico, se describe en la presente la secuencia de nucleótidos sec. con núm. de ident.:65, que codifica una cadena ligera de h2B6, secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:66. La secuencia de nucleótidos puede codificar una cadena pesada y/o cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:70 y sec. con núm. de ident.:66, respectivamente.

Se describe el uso de los anticuerpos humanizados para detectar la presencia de FcγRIIB específicamente y (*es decir*, FcγRIIB y no FcγRIIA) en una muestra biológica.

Los receptores de Fc de activación e inhibidores, *por ejemplo*, FcγRIIA y FcγRIIB, son críticos para la función de equilibrio de estos receptores y las respuestas inmunitarias celulares adecuadas. Se describe además el uso de los anticuerpos humanizados para el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de tal equilibrio y control regulado en la vía de señalización del receptor de Fc. Así, los anticuerpos humanizados de FcγRIIB de la invención tienen usos para regular la respuesta inmunitaria, *por ejemplo*, para inhibir la respuesta inmunitaria en conexión con enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias o respuesta alérgica. Los anticuerpos humanizados de FcγRIIB de la invención se pueden usar además para alterar ciertas funciones efectoras para mejorar, por ejemplo, la citotoxicidad mediada por anticuerpos terapéuticos.

Los anticuerpos humanizados de la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, por ejemplo, en una modalidad, como una terapia de agente único. En una modalidad de la invención, los anticuerpos humanizados de la invención son útiles para la prevención o el tratamiento de las malignidades de células B, particularmente el linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica crónica. En modalidades particulares, el cáncer del sujeto es refractario a una o más terapias estándar o experimentales, particularmente, al tratamiento con Rituxan. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar para el tratamiento, manejo, prevención, o mejora de las enfermedades de células B, tales como, leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), linfoma no-Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular con áreas de linfoma difuso de células B grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, y linfoma difuso de células pequeñas hendidas.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en conjunto con un régimen de tratamiento estándar o experimental para malignidades de células B (*por ejemplo*, quimioterapia, radioinmunoterapia, o radioterapia). Tal terapia de combinación puede mejorar la eficacia del tratamiento estándar o experimental. Los ejemplos de agentes terapéuticos que son particularmente útiles en conjunto con un anticuerpo específico a FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este, para la prevención, tratamiento, manejo, o mejora de malignidades de células B, incluyen, pero sin limitarse a, Rituxan, interferón-alfa, y agentes anti-cáncer. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en conjunto con un anticuerpo específico a FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este, incluyen, pero sin limitarse a agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, y hormonas. Las terapias de combinación de la invención permiten dosis más bajas de un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este y/o administración menos frecuente de anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este a un sujeto con una malignidad de células B, para lograr un efecto terapéutico o profiláctico.

El uso de un anticuerpo humanizado de FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este prolonga la supervivencia de un sujeto diagnosticado con una malignidad de células B.

En una modalidad preferida, los anticuerpos humanizados de la invención se usan para el tratamiento y/o prevención del melanoma. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados son útiles para la prevención y/o tratamiento de cáncer, particularmente para potenciar la actividad citotóxica de anticuerpos terapéuticos específicos al antígeno de cáncer con actividad citotóxica para mejorar la muerte de célula tumoral y/o mejorar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo ("ADCC"), actividad citotóxica dependiente de complemento ("CDC"), o fagocitosis de los anticuerpos terapéuticos.

Se describe además un método para tratar el cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer anticuerpo humanizado o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o fragmento de este se une a FcγRIIA, y un segundo anticuerpo que se une

5 específicamente a dicho antígeno de cáncer y es citotóxico. Se describe además un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, dicho método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano nativo, con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA, preferentemente FcγRIIA humano nativo, y el dominio constante del cual tiene además una afinidad aumentada para uno o más receptores de Fc de activación, cuando el anticuerpo es monomérico, tal como FcγRIIIA, y un anticuerpo que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer y es citotóxico. En una modalidad particular, dicho receptor de activación de Fc es FcγRIIIA.

10 En algunas modalidades, la invención abarca anticuerpos que comprenden variantes de regiones Fc que se unen a FcRn con una afinidad mejorada, lo que resulta en una vida media aumentada del anticuerpo, por ejemplo, una vida media mayor de 15 días, preferentemente mayor de 20 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses, o mayor de 5 meses. Aunque no pretende estar limitado por un mecanismo de acción particular el receptor neonatal Fc (FcRn) juega un papel importante para regular las vidas medias en el suero de anticuerpos IgG. Se ha establecido una correlación entre la afinidad de unión dependiente del pH de anticuerpos de IgG a FcRn y sus vidas medias en el suero en ratones. Las vidas medias aumentadas de los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de estos en un mamífero, preferentemente un humano, resulta en un título de suero más alto de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y así, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reduce la concentración que se administra de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de estos con vidas medias *in vivo* aumentadas se pueden generar modificando (por ejemplo, sustitución, delección o adición) residuos de aminoácidos identificados como los involucrados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. Por ejemplo, la invención abarca anticuerpos que comprenden variantes de regiones Fc con al menos uno o más que modificaciones que mejoran la afinidad a FcRn, *por ejemplo*, una modificación de uno o más residuos aminoácido 251-256, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-436, o una modificación en las posiciones 250 y 428, ver, *por ejemplo*, Hinton y otros, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6; publicación del PCT núm. WO 97/34631; y WO 02/060919.

30 Se describe un método para regular la activación celular mediada por el complejo inmunitario en un paciente, dicho método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano y bloquea el sitio de unión a FcγRIIB humano. Preferentemente, la administración del anticuerpo o fragmento de este resulta en una respuesta inmunitaria mejorada, tal como un aumento en una respuesta celular dependiente de anticuerpo. Adicionalmente se prefiere que la activación de células mediadas por el complejo inmunitario es la activación de células B, activación de mastocitos, activación de células dendríticas o activación de macrófagos.

40 Adicionalmente se describe un método para romper la tolerancia a un antígeno en un paciente, dicho método que comprende administrar a un paciente que lo necesita (1) un complejo antígeno-anticuerpo que comprende dicho antígeno y (2) un anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano y bloquea el sitio de unión Fc de FcγRIIB humano, de ese modo rompiendo la tolerancia en dicho paciente a dicho antígeno. El anticuerpo o fragmento de este se pueden administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración de dicho complejo antígeno-anticuerpo.

45 Se describe además un método para mejorar un efecto citotóxico mediado por anticuerpo en un sujeto que se trata con un anticuerpo citotóxico, dicho método que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo humanizado de la invención, o un fragmento de este, en una cantidad suficiente para mejorar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. Un método para aumentar un efecto citotóxico mediado por anticuerpos en un sujeto que se trata con un anticuerpo citotóxico se describe además, dicho método que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo humanizado de la invención, o un fragmento de este, que tiene además una afinidad mejorada para un receptor inhibidor Fc, cuando es monomérico, en una cantidad suficiente para mejorar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. El método puede comprender además la administración de uno o más terapias contra el cáncer.

50 Los anticuerpos humanizados discutidos se pueden usar en conjunto con cualquier anticuerpo terapéutico que media su efecto terapéutico a través de la muerte celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados potencian la actividad terapéutica del anticuerpo mejorando la función efectora mediada por anticuerpos, los anticuerpos humanizados potencian la actividad terapéutica del anticuerpo citotóxico mejorando la fagocitosis y opsonización de las células tumorales específicas, los anticuerpos humanizados potencian la actividad terapéutica del anticuerpo mejorando la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales específicas. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención se usan en conjunto con las proteínas de fusión Fc para mejorar la ADCC.

60 Aunque no pretende estar limitado por un mecanismo de acción particular, la combinación de un anticuerpo humanizado de la invención en conjunto con un anticuerpo terapéutico tiene un efecto terapéutico mejorado debido, en parte, a la capacidad citotóxica del anticuerpo humanizado específico a FcγRIIB para eliminar macrófagos que expresan los

receptores inhibidores Crib. Por lo tanto, existe una concentración más alta de células que expresan receptores activadores Fig que permanecen por dosis del anticuerpo terapéutico.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en conjunto con un anticuerpo terapéutico que no media su efecto terapéutico a través de la muerte celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. En una modalidad específica, los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en conjunto con un anticuerpo terapéutico inductor de la apoptosis con actividad agonista, *por ejemplo*, anticuerpo anti-Fas. La apoptosis terapéutica que inducen los anticuerpos puede ser específica para cualquier receptor de muerte conocido en la técnica para la modulación de la vía apoptótica, *por ejemplo*, miembro de la familia del receptor TNFR o un miembro de la familia TRAIL.

10 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar para bloquear la progresión celular del tumor mediada por macrófago y metástasis. Los anticuerpos humanizados de la invención son útiles en el tratamiento particular de tumores sólidos, donde ocurre la infiltración de macrófago. Los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención son particularmente útiles para controlar *por ejemplo*, reducir o eliminar, metástasis de la célula tumoral, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que se localizan en el sitio del tumor. La invención abarca además anticuerpos humanizados que reducen eficazmente o eliminan células efectoras inmunitarias distintas de los macrófagos que expresan FcγRIIB, *por ejemplo*, células dendríticas. La reducción eficaz o eliminación de las células efectoras inmunitarias usando los anticuerpos de la invención se puede extender de una reducción de la población de las células efectoras por 50%, 60%, 70%, 80%, preferentemente 90% y con la máxima preferencia 99%.

15 En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en conjunto con anticuerpos terapéuticos que se unen inmuno-específicamente a los antígenos tumorales que no se expresan en las mismas células tumorales, sino más bien en las células no malignas que sostienen al tumor y reactivas circundantes, que comprenden el estroma tumoral. En una modalidad preferida, un anticuerpo humanizado de la invención se usa en conjunto con un anticuerpo que se une inmuno-específicamente al antígeno tumoral en una célula de fibroblasto, *por ejemplo*, proteína de activación de fibroblastos (FAP).

20 Se discute además un método para tratar un trastorno autoinmunitario en un paciente que lo necesita, dicho método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos humanizados de la invención. Se proporciona además un método para tratar un trastorno autoinmunitario en un paciente que lo necesita, dicho método que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes anti-inflamatorios, y/o uno o más agentes inmunomoduladores. Se discuten además métodos para tratar o mejorar los síntomas de enfermedades autoinmunitarias que incluyen, pero sin limitarse a, Diabetes Tipo I, psoriasis, artritis reumatoide, lupus (particularmente, cutáneo), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple. Los métodos se pueden usar en sujetos con enfermedad de etapa temprana para frenar o reducir el daño de la autoinmunidad y mantener un alto nivel de funcionalidad y/o reducir la necesidad de o evitar un aumento en el nivel de otra terapia, *por ejemplo*, administraciones de un inmunosupresor o un anti-inflamatorio.

25 Se describe un método para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, dicho método que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos humanizados de la invención. Adicionalmente se proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, dicho método que comprende además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes anti-inflamatorios, y/o uno o más agentes inmunomoduladores.

30 Se proporciona además un método para mejorar una respuesta inmunitaria a una composición de vacuna en un sujeto, dicho método que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a FcγRIIB con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA, y una composición de vacuna, tal que dicho anticuerpo o un fragmento de este se administra en una cantidad eficaz para mejorar la respuesta inmunitaria a dicha composición de vacuna en dicho sujeto. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar para mejorar una respuesta mediada por la célula y/o humoral contra el antígeno(s) de la composición de vacuna. Los anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con cualquier vacuna conocida en la técnica. Se analiza además el uso de los anticuerpos humanizados de la invención ya sea para evitar o tratar un trastorno particular, donde una respuesta inmunitaria mejorada contra un antígeno o antígenos en particular es eficaz para tratar o evitar la enfermedad o trastorno.

35 Se describe además un método para mejorar la terapia inmunitaria para un agente infeccioso en donde los anticuerpos humanizados de la invención se administran a un paciente que ya está infectado por un patógeno, tales como VIH, VHC o HSV para mejorar la opsonización y fagocitosis de las células infectadas. Adicionalmente se describen los métodos para tratar la sepsis o shock séptico usando anticuerpos humanizados de la invención. El papel de FcγRIIB en la sepsis se ha descrito en Clatworthy y otros, 2004, J Exp Med 199:717-723; incorporado en la presente como referencia en su totalidad.

40 Un método para tratar enfermedades con señalización mediada por apoptosis deficiente, *por ejemplo*, cáncer,

enfermedad autoinmunitaria se describe, por ejemplo, un método para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, dicho método que comprende administrar un anticuerpo humanizado de la invención en conjunto con un anticuerpo anti-Fas.

5 Se analiza además un método 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 agonistas humanizados de la invención. Se proporciona adicionalmente un método para tratar o evitar un trastorno alérgico mediado por IgE en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente de los anticuerpos humanizados de la invención en combinación con otros anticuerpos terapéuticos o composiciones de vacuna usadas para el tratamiento o la prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE.

10 Se discute además el uso de un anticuerpo específico de FcγRIIB conjugado con un agente terapéutico o fármaco. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden conjugar con un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de este incluyen, pero sin limitarse a, citoquinas, toxinas, elementos radiactivos, y antimetabolitos.

15 La invención proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto que comprende: (i) contactar una muestra biológica de dicho sujeto con una cantidad eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención; y (ii) detectar la unión de dicho anticuerpo humanizado o un fragmento de este, en donde la detección de dicho marcador detectable por encima del nivel estándar o de fondo indica que dicho sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria.

20 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o un fragmento de este que se une específicamente a FcγRIIB con afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado de la invención; (ii) un anticuerpo citotóxico que se une específicamente a un antígeno de cáncer; y (iii) un portador aceptable farmacéuticamente. En una modalidad específica, el anticuerpo o fragmento de este se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humana bloquea el sitio de unión Fc de FcγRIIB humano, y además bloquea la reticulación de FcγRIIB a un receptor Fc. En una modalidad específica, la región Fc del anticuerpo de la invención comprende una o más de una alanina en la posición 265, una glutamina en posición 297, leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, o una leucina en la posición 396. En aún otra modalidad, el anticuerpo o fragmento de este que se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano y bloquea el sitio de unión Fc de FcγRIIB humano comprende una región Fc que comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc silvestre, tal que la región Fc modificada tiene una afinidad de unión alterada al receptor Fc. En una modalidad específica, la modificación de aminoácido comprende la sustitución en la posición 265 o 297, preferentemente una sustitución en la posición 265 con alanina o una sustitución en la posición 297 con glutamina. En otra modalidad, la modificación de aminoácido comprende una sustitución en la posición 243, 292, 300, 305 y 396, preferentemente una sustitución en 243 con leucina, una sustitución en la posición 292 con prolina, una sustitución en la posición 300 con leucina, una sustitución en la posición 305 con isoleucina, y una sustitución en la posición 396 con leucina.

40 Se describen además los métodos de terapia de combinación. Los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en combinación con cualquier tratamiento estándar para la indicación particular, *por ejemplo*, en el caso del tratamiento de cáncer, quimioterapia estándar y/o agentes anti-angiogénicos y, en el caso del tratamiento de un trastorno autoinmunitario, inmunosupresor estándar y/o tratamientos anti-inflamatorios. Los anticuerpos y/o composiciones de la invención se pueden administrar con otras terapias tales como agentes anti-inflamatorios, terapias esteroideas (por ejemplo, pero sin limitarse a, glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, triamcinolona, azulfidina, etc.), antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS) (por ejemplo, pero sin limitarse a, inhibidores COX-2, aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, ketoloraco, oxaprozin, nabumetona, sulindaco, tolmetina, naproxeno, cetoprofeno, etc.), beta-agonistas, agentes anticolinérgicos, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, pero sin limitarse a, moduladores de receptores de células T, moduladores de receptores de citoquinas, agentes de reducción de células T, antagonistas de citoquinas, agonistas de monocinas, inhibidores de linfocinas, etc.), inmunosupresores (tales como, pero sin limitarse a, metotrexato o ciclosporina), agentes anti-angiogénicos (por ejemplo, angiostatina y TNF-alfa, antagonistas y/o inhibidores (por ejemplo, pero sin limitarse a, etanercept e infliximab)), dapsona y psoralenos. Los sujetos que se han vuelto refractarios a los tratamientos convencionales se tratan usando métodos descritos en la presente.

50 En ciertas modalidades de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con los métodos de la invención, dichas composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo FcγRIIB humanizado o un fragmento de unión a antígeno de este, en una cantidad eficaz para evitar, tratar, manejar o mejorar una malignidad de células B, o uno o más de sus síntomas, y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con los métodos de la invención, dichas composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de FcγRIIB humanizado o un fragmento de unión a antígeno de este, un agente profiláctico o terapéutico distinto de un antagonista de FcγRIIB, y un portador farmacéuticamente aceptable.

65 Los anticuerpos y/o composiciones de la invención se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía

intravenosa, intramuscular o subcutánea, o, alternativamente, se pueden administrar por vía oral. Los anticuerpos y/o composiciones de la invención se pueden administrar además como una formulación de liberación sostenida.

4.1 Definiciones

5

Como se usa en la presente, el término "se une específicamente a FcyRIIB" y términos análogos se refiere a los anticuerpos o fragmentos de estos (o cualquier otra molécula de unión a FcyRIIB) que se unen específicamente a FcyRIIB o un fragmento de este y que no se unen específicamente a otros receptores Fc, particularmente a FcyRIIA. Además, se entiende por uno con experiencia en la técnica, que un anticuerpo que se une específicamente a FcyRIIB, puede unirse a través del dominio variable o el dominio constante del anticuerpo. Si el anticuerpo que se une específicamente a FcyRIIB se une a través de su dominio variable, se entiende por uno con experiencia en la técnica que no está agregado, *es decir*, es monomérico. Un anticuerpo que se une específicamente a FcyRIIB puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad más baja, como se determinó, *por ejemplo*, por inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a FcyRIIB o un fragmento de este no presentan reacción cruzada con otros antígenos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a FcyRIIB se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Un anticuerpo o un fragmento de este se une específicamente a un FcyRIIB mientras se une a FcyRIIB con una afinidad más alta que a cualquier antígeno de reacción cruzada, como se determinó usando técnicas experimentales, tales como transferencias por western, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). *Ver, por ejemplo*, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Segunda Edición, Raven Press, Nueva York en las páginas 332-336 para una discusión sobre la especificidad de los anticuerpos.

Como se usa en la presente, el término "FcyRIIB nativo" se refiere a FcyRIIB el cual se expresa de forma endógena y está presente en la superficie de una célula. En algunas modalidades "FcyRIIB nativo" abarca una proteína que se expresa de forma recombinante en una célula de mamífero. Preferentemente, el FcyRIIB nativo no se expresa en una célula bacteriana, *es decir*, *E. coli*. Con la máxima preferencia el FcyRIIB nativo no está desnaturalizado, *es decir*, está en su conformación biológicamente activa.

Como se usa en la presente, el término "endógeno" en el contexto de una proteína celular se refiere a la proteína de origen natural y/o expresada por la célula en ausencia de manipulación recombinante; como consecuencia, los términos "proteína expresada de forma endógena" o "proteína endógena" excluye las proteínas celulares expresadas por medio de tecnología recombinante.

Como se usa en la presente, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs unidos por puentes disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, *por ejemplo*, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para los anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Particularmente, 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 (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clases (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

A menos que se indique de cualquier otra forma, cuando se refieren a los anticuerpos (como se define en general en la presente), la referencia a dominios de anticuerpos y/o posiciones de aminoácido dentro de anticuerpos, o fragmentos de estos, está de acuerdo con la definición y asignación de aminoácidos a cada dominio en Kabat y otros, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ta Edición Servicio Público de Salud (Instituto Nacional de salud, Bethesda, Maryland, 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describe numerosas secuencias de aminoácidos para los anticuerpos, una secuencia consenso de aminoácidos identificada para cada subgrupo, y se les asigna un número al residuo para cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es extensible a los anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat como referencia a los aminoácidos conservados. Este método para asignar los números al residuo se ha convertido en estándar en el campo y fácilmente identifica los aminoácidos en las posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, que incluyen variantes quiméricos o humanizados. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera del anticuerpo de ratón. Así, como se usa en la presente en el contexto de los anticuerpos humanizados, una referencia tal como "en la posición 297 de la región Fc" se refiere a la posición del aminoácido en una cadena de inmunoglobulina, región de una cadena de inmunoglobulina, o región de un polipéptido derivado de una cadena de inmunoglobulina, correspondiente a la posición 297 de la inmunoglobulina humana correspondiente.

Como se usa en la presente, los términos "malignidades de células B" y "malignidad de células B" se refiere a cualquier trastorno linfoproliferativo de células B. Las malignidades de células B incluyen los tumores de origen de células B. Las malignidades de células B incluyen, pero sin limitarse a, linfomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias

linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y de no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular con áreas de linfoma difuso de células B grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, y linfoma difuso de células pequeñas hendidas.

5 Como se usa en la presente, el término "derivado" en el contexto de un polipéptido o proteína, *por ejemplo* un anticuerpo, se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácido que se ha alterado por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. El término "derivado" como se usa en la presente se refiere además a un polipéptido o proteína que se ha modificado, *es decir*, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido o proteína se puede modificar, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, *etc.* Un polipéptido o proteína derivado se puede producir por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Además, un polipéptido o proteína derivado posee una función similar o idéntica a la del polipéptido o proteína a partir de la que se derivó.

El término "derivado", como se usa en la presente en el contexto de un anticuerpo de Fc γ R1IB se refiere a un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de Fc γ R1IB o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de Fc γ R1IB, que ha sido alterado por la introducción de uno o más sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácido (*es decir*, mutaciones) en una o más regiones/dominios del anticuerpo (*por ejemplo*, CDRs, región Fc, región bisagra, regiones marco). El derivado de anticuerpo puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión, o peor unión cuando se compara con el anticuerpo no derivado. En modalidades específicas, uno, dos, tres, cuatro, o cinco residuos de aminoácidos de la CDR y/o región Fc se sustituyen, eliminan o añaden (*es decir*, mutan). El término "derivado" como se usa en la presente junto con Fc γ R1IB se refiere además con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de Fc γ R1IB, o un fragmento de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de Fc γ R1IB que ha sido modificado, *es decir*, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se puede modificar *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína. Un anticuerpo derivado o fragmento de anticuerpo se pueden modificar por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Además, un derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. En una modalidad, un anticuerpo derivado posee una función similar o idéntica como el anticuerpo parental. En otra modalidad, un derivado de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo tiene una actividad alterada cuando se compara con un anticuerpo inalterado. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este se puede unir a su epítipo más fuertemente o ser más resistentes a la proteólisis.

Como se usan en la presente, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a una afección en un sujeto. Particularmente, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/o de órgano provocada por una reacción inmunológica del sujeto frente a sus propias células, tejidos y/o órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa de manera intercambiable con el término "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, ciertos trastornos se pueden caracterizar como ambos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios.

Como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o un tumor resultante de un crecimiento no controlado anormal de células. Como se usa en la presente, el cáncer incluye explícitamente, leucemias y linfomas. El término "cáncer" se refiere a una enfermedad que implica las células que tienen el potencial de producir metástasis en sitios distales y exhiben rasgos fenotípicos que difieren de las células no cancerosas, por ejemplo, formación de colonias en el sustrato tridimensional tal como agar blando o la formación de redes tubulares o matrices de banda continua en una membrana basal tridimensional o preparación de matriz extracelular. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando y forman distintas estructuras de tipo esfera en la membrana basal tridimensional o preparaciones de matriz extracelular. Las células cancerosas adquieren el conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diversos mecanismos. Tales capacidades incluyen evadir la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, invasión/metástasis de tejidos, potencial ilimitado explicativo, y angiogénesis sostenida. El término "célula cancerosa" denota abarcar tanto las células cancerosas pre-malignas como malignas. En algunas modalidades, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras modalidades, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras vecinas del cuerpo y propagado a sitios distantes. En otras modalidades, el cáncer se asocia con un antígeno específico de cáncer.

Como se usa en la presente, el término "agente inmunomodulador" y variaciones de estos que incluyen, pero sin limitarse a, agentes inmunomoduladores, se refieren a un agente que modula el sistema inmunológico de un huésped.

En ciertas modalidades, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En otras ciertas modalidades, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitarse a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos, y moléculas orgánicas.

5 Como se usa en la presente, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de una proteína o polipéptido que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y con la máxima preferencia en un humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al cual un anticuerpo se une inmunoespecíficamente como se determinó por cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesitan necesariamente ser inmunogénicos.

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

25 Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina que comprende la región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por lo general un ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se llama el "donador" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se llama el "aceptor". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferentemente aproximadamente 95% o más idénticos. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina con una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado podría no abarcar un anticuerpo quimérico típico, ya que, *por ejemplo*, toda la región variable de un anticuerpo quimérico no es humana. El término "humanización" se refiere al proceso de creación del anticuerpo humanizado. Se espera unir el anticuerpo humanizado resultante al mismo antígeno como el anticuerpo donador que proporciona las CDR. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tales como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la Región Marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente esa de una inmunoglobulina humana que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de FcγRIIB, que ha sido alterado por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones). En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado es un derivado. Un anticuerpo humanizado de ese tipo comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más CDR no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión, o peor unión cuando se compara con el anticuerpo humanizado no derivado. En modalidades específicas, uno, dos, tres, cuatro, o cinco residuos de aminoácidos de la CDR se han sustituido, delecionado o añadido (es decir, mutado). Para detalles adicionales de los anticuerpos humanizantes, ver las patentes europeas núms. EP 239,400, EP 592,106, y EP 519,596; las publicaciones internacionales núms. WO 91/09967 y WO 93/17105; las patentes de Estados Unidos núms. 5,225,539, 5,530,101, 5,565,332, 5,585,089, 5,766,886, y 6,407,213; y Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka y otros, 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska y otros, 1994, PNAS 91:969-973; Tan y otros, 2002, J. Immunol. 169:1119-25; Caldas y otros, 2000, Protein Eng. 13:353-60; Morea y otros, 2000, Methods 20:267-79; Baca y otros, 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84; Roguska y otros, 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto y otros, 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s; Couto y otros, 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen y otros, 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones y otros, 1986, Nature 321:522-525; Reichmann y otros, 1988, Nature 332:323-329; y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

5 Como se usa en la presente, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (*es decir*, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada de acuerdo con Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (*es decir*, 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917. "Región Marco" o residuos "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en la presente.

15 Como se usa en la presente, los términos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refieren a los fragmentos de anticuerpo que comprende los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido de Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, *ver* Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); incorporada en la presente como referencia en su totalidad. En modalidades específicas, scFvs incluye scFvs biespecíficos y scFvs humanizados.

20 Como se usa en la presente, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencia de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (*por ejemplo*, ADNc o ADN genómico), moléculas ARN (*por ejemplo*, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbrido, y análogos de moléculas ADN o ARN. Tales análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitarse a, inosina o bases tritiladas. Tales análogos pueden comprender además moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que proporcionan atributos beneficiosos para las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasa o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. Las secuencia de nucleótidos o ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla, de cadena doble, puede contener tanto cadena sencilla como porciones de cadena doble, y puede contener porciones de cadena triple, pero preferentemente es ADN de cadena doble.

30 Como se usa en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Como se usa en la presente, el sujeto es preferentemente un mamífero, tal como un no-primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (*por ejemplo*, mono y humano), con la máxima preferencia un humano.

35 Como se usa en la presente, los términos "trata", "tratar" y "tratamiento" se refieren a la erradicación, reducción o mejora de los síntomas de una enfermedad o trastorno relacionado con la pérdida de la regulación de la vía de señalización del receptor Fc o para mejorar la eficacia terapéutica de otra terapia, *por ejemplo*, un anticuerpo terapéutico, terapia con vacuna o profilaxis. En algunas modalidades "tratamiento se refiere a a erradicación, eliminación, modificación, o el control de tejido de cáncer primario, regional o metastásico que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos. En ciertas modalidades, dichos términos se refieren a la minimización o retraso de la propagación del cáncer resultante de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con una enfermedad de ese tipo. En otras modalidades, tales términos se refieren a la eliminación de las células causantes de enfermedades.

45 Como se usa en la presente, la frase "efectos secundarios" abarca efectos no deseados y adversos de un agente profiláctico o terapéutico. Los efectos adversos son siempre efectos no deseados, pero los efectos no deseados no son necesariamente efectos adversos. Un efecto adverso de un agente profiláctico o terapéutico podría ser dañino o incómodo o riesgoso. Los efectos secundarios de la quimioterapia incluyen, pero sin limitarse a, toxicidad gastrointestinal tales como, pero sin limitarse a, diarrea y flatulencia de formación tarde y temprano, náusea, vómito, anorexia, leucopenia, anemia, neutropenia, astenia, retortijón abdominal, fiebre, dolor, pérdida de peso, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio, mareos, mucositis, xerostomía e insuficiencia renal, así como estreñimiento, efectos en nervios y músculos, daño temporal o permanente a los riñones y vejiga, síntomas parecidos a la gripe, retención de líquido, e infertilidad temporal o permanente. Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen pero no sin limitarse a la fatiga, sequedad de boca, y pérdida de apetito. Los efectos secundarios de las terapias biológicas/inmunoterapias incluyen, pero sin limitarse a erupciones o hinchazón en el sitio de administración, síntomas parecidos a la gripe, como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos secundarios de las terapias hormonales incluyen pero sin limitarse a náuseas, problemas de fertilidad, depresión, pérdida de apetito, problemas en los ojos, dolor de cabeza, y fluctuación del peso. Efectos indeseados adicionales típicamente experimentados por los pacientes son numerosos y conocidos en la técnica, *ver, por ejemplo*, el *Physicians' Desk Reference* (56.o ed., 2002).

60 Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad o trastorno asociado con FcyRIIB y cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de regulación en la vía de señalización del receptor Fc o para mejorar la eficacia terapéutica de otra terapia, *por ejemplo*, anticuerpo terapéutico, terapia con vacuna, o profilaxis *etc.* Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede referir a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de la enfermedad, *por ejemplo*, retardar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse además a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo 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 conjunto con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo de una enfermedad, *por ejemplo*, suficiente para mejorar la eficacia terapéutica de un anticuerpo terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de anticuerpo de FcγRIIB de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejora el tratamiento en general, reduce o evita efectos no deseados o mejora la eficacia terapéutica de o hace sinergia con otro agente terapéutico.

Como se usan en la presente, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente(s) que se puede(n) usar en la prevención de un trastorno, o prevención de recurrencia o la propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede referir a la cantidad de agente profiláctico suficiente para evitar la recurrencia o propagación de la enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de ella en un paciente, que incluyen, pero sin limitarse a los predispuestos a enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, los genéticamente predispuestos al cáncer o expuestos anteriormente a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz se puede referir además a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico de la prevención 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 conjunto con otros agentes, que proporciona un beneficio para evitar la enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de un anticuerpo de FcγRIIB de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejora la profilaxis en general o mejora la eficacia profiláctica de o hace sinergia con otro agente profiláctico, tal como, pero sin limitarse a un anticuerpo terapéutico. En ciertas modalidades, el término "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo agonista específico a FcγRIIB. En otras modalidades, el término "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo antagonista específico a FcγRIIB. En otras ciertas modalidades, el término "agente profiláctico" se refiere a la quimioterapéuticos del cáncer, radioterapia, terapia hormonal, terapia biológica (*por ejemplo*, inmunoterapia), y/o anticuerpos de FcγRIIB de la invención. En otras modalidades, más de un agente profiláctico se pueden administrar en conjunto.

Como se usa en la presente, los términos "manejar", "manejando" y "manejo" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de la administración de un agente profiláctico o terapéutico, que no resulta en una cura de la enfermedad. En ciertas modalidades, a un sujeto se administra uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para "manejar" una enfermedad para evitar la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

Como se usa en la presente, los términos "evitar", "evitando" y "prevención" se refieren a la prevención de la ocurrencia y/o recurrencia o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en la presente, el término "en conjunto" se refiere al uso de más de un agentes profiláctico y/o terapéutico. El uso del término "en conjunto" no restringe el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto con un trastorno, *por ejemplo*, trastorno celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (*por ejemplo*, 1 minuto, 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), conjuntamente con, o posteriormente a (*por ejemplo*, 1 minuto, 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 profiláctico o terapéutico a un sujeto que tuvo, tiene, o es susceptible a un trastorno. Los agentes profilácticos o terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que el agente de la invención puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio aumentado que si se administran de cualquier otra forma. Cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional se puede administrar en cualquier orden con otros agentes profilácticos o terapéuticos adicionales.

5. Breve descripción de las figuras

Figuras 1A y B. A. ALINEACIONES DE AMINOÁCIDOS. La alineación de las secuencias de aminoácidos de 2B6 VH de ratón, 2B6 VH-1 humanizado, VH1-18 y JH6 humana se muestra en la Figura 1A. **B. ALINEACIONES DE AMINOÁCIDOS.** Esta figura muestra la alineación de las secuencias aminoácidos de 2B6 VL murino, 2B6 VL-1 humano, 2B6 VL-2 humano; 2B6 VL-3 humano, y Jκ4 humano.

Figura 2A y 2B. A. ALINEACIONES DE AMINOÁCIDOS. La alineación de las secuencias de aminoácidos de 2B6 VH-1 humanizado y 2B6 VH 3 humanizado (sec. con núm. de ident.: 68) se muestra en la Figura. 2A. **B. ALINEACIONES DE AMINOÁCIDOS.** Esta figura muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de 2B6 VL-1, 2B6 VL-2, 2B6 VL-3, y 2B6 VL-5 humanizado (sec. con núm. de ident: 62). Para las Figuras 2A y 2B, las CDR se indican por subrayado, y las diferencias en la secuencia de aminoácidos se indican por letra negrita.

Figura 3. UNIÓN DE hu2B6HC/ch2B6LC mAb Y ch2B6 mAb A FcγRIIB. La unión a FcγRIIB-Fc dimérico soluble se determinó por ELISA. El anticuerpo monoclonal hu2B6HC/ch2B6LC se unió al receptor con una afinidad similar al anticuerpo monoclonal ch2B6.

Figura 4. UNIÓN DE ch2B6 mAb, h2B6 (v3.5) mAb y h2B6 (v1.1) mAb a FcγRIIB. La unión a FcγRIIB-Fc dimérico soluble se determinó por ELISA. Un anticuerpo monoclonal hu2B6 (v3.5) se unió al receptor con una afinidad similar al anticuerpo monoclonal ch2B6. Anticuerpo

Figura 5. UNIÓN DE hu2B6LC/ch2B6HC mAb, ch2B6LC/hu2B6HC, Y ch2B6 mAb A FcyRIIB. La unión a FcyRIIB-Fc dimérico soluble se determinó por ELISA. hu2B6HC/ch2B6LC mAb y ch2B6HC/hu2B6LC mAb se unieron al receptor con afinidad similar al ch2B6 mAb.

Figura 6. UNIÓN DE VARIANTES DE hu2B6 A FcyRIIB. La unión de Hu2B6N50Y; Hu2B6N50Y, V51A; Ch2B6, y Hu2B6 a FcyRIIB-Fc dimérico soluble se determinó por ELISA. Todos los mAbs se unen al receptor con una afinidad similar.

Figura 7. UNIÓN DE VARIANTES DE hu2B6 A FcyRIIA. La unión de Hu2B6N50Y; Hu2B6N50Y, V51A; Ch2B6 y Hu2B6 a FcyRIIA-Fc dimérico soluble se determinó por ELISA. Los 2B6 mAb humanizados se unen selectivamente a CD32B. Todos los puntos sólidos de los datos caen uno encima del otro y sólo se muestran como un cuadrado sólido.

Figuras 8A y 8B. ESTIMADO DEL PESO DE TUMOR EN RATONES TRATADOS CON h2B6 SILVESTRE o MUTANTE Fc. Ratones desnudos Balb/c se inocularon por vía subcutánea con células Daudi y administraron dosis de 25 µg, 2.5 µg o 0.25 µg semanalmente ya sea de h2B6 silvestre (**A**) o a una variante h2B6 que comprende un dominio Fc con una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396; (**B**). Los ratones administrados con tampón solo se usaron como control. Se calculó el peso del tumor basado en el volumen estimado del tumor subcutáneo de acuerdo con la fórmula $(\text{ancho}^2 \times \text{longitud})/2$.

Figuras 9A y 9B. SUPERVIVENCIA EN RATONES PORTADORES DE TUMOR TRATADOS CON h2B6 SILVESTRE o MUTANTE Fc. Ratones desnudos se inocularon con células Daudi y administraron con dosis de 25 µg, 2.5 µg o 0.25 µg, semanalmente ya sea de h2B6 silvestre (**A**) o una variante h2B6 que comprende un dominio Fc con 243L, 292P, 300L, 305I, y 396L; (**B**). Los ratones administrados con tampón solo se usaron como control.

6. Descripción de las modalidades preferidas

6.1 Anticuerpos específicos a FcyRIIB

La presente invención abarca anticuerpos humanizados (preferentemente anticuerpos monoclonales humanizados) o fragmentos de estos que se unen específicamente a FcyRIIB, preferentemente FcyRIIB humano, con mayor preferencia FcyRIIB humano nativo con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a FcyRIIA, preferentemente FcyRIIA humano, con mayor preferencia FcyRIIA humano nativo. Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la invención se unen al dominio extracelular de FcyRIIB humano nativo. En ciertas modalidades, los anticuerpos humanizados o fragmentos de estos se unen a FcyRIIB con una afinidad mayor de dos veces, cuatro veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces, 10^7 veces, o 10^8 veces que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a FcyRIIA. En una modalidad particular, el anticuerpo humanizado de la invención se deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, con el número de acceso ATCC PTA-4591. Los anticuerpos humanizados descritos en la presente se pueden derivar de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2, con números de acceso ATCC PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los anticuerpos 2B6 y 3H7 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 Universidad Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimientos de Patentes, y se les asignó los números de acceso PTA-4591 (para el hibridoma que produce 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma que produce 3H7), respectivamente. Los hibridomas que producen 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 se depositaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10.801 Universidad Blvd., Manassas, Virginia. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004, y se les asignó los números de acceso PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959.

Todavía en otras modalidades, la invención abarca anticuerpos humanizados de FcyRIIB que se unen exclusivamente a FcyRIIB y no tienen afinidad por FcyRIIA usando métodos estándar conocidos en la técnica y descritos en la presente.

Se describe en la presente un anticuerpo humanizado, que comprenden las CDR de 2B6 o de 3H7. Particularmente, un anticuerpo humanizado con el dominio variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 24, sec. con núm. de ident.:60 o sec. con núm. de ident.:68 y el dominio variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 62. En un caso específico, un anticuerpo humanizado con el dominio variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 37 y el dominio variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 46. La invención abarca un anticuerpo humanizado con el dominio variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:68 y el dominio variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:62. Todavía en otra modalidad preferida, los anticuerpos humanizados de la invención además no se unen a los receptores de activación Fc, *por ejemplo*, FcγIIIA, FcγIIIB, *etc.* En una modalidad, el anticuerpo humanizado específico a FcyRIIB de acuerdo con la invención no se deriva del anticuerpo monoclonal denominado KB61, como se describe en Pulford y otros, 1986 (Immunology, 57: 71-76) o el anticuerpo monoclonal designado MAbII8D2 como se describe en Weinrich y otros, 1996, (Hybridoma, 15(2):109-6). En una modalidad específica, el anticuerpo específico a FcyRIIB de la invención no se une al mismo epítipo y/o no compite con la unión con el anticuerpo monoclonal KB61 o II8D2. Preferentemente, los anticuerpos humanizados específicos a

FcyRIIB de la invención no se unen a la secuencia de aminoácidos SDPNFSI correspondiente a las posiciones 135-141 de la isoforma FcyRIIb2.

5 Los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención se pueden seleccionar con respecto a la función propuesta del anticuerpo, particularmente con respecto a la función efectora que se pueda requerir. En algunas modalidades, los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención son los dominios de IgA, IgE, IgG o IgM humana. En una modalidad específica, se usan los dominios constantes de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, especialmente cuando los anticuerpos humanizados de la invención se pretenden para usos terapéuticos y se necesitan funciones efectoras de anticuerpos. En modalidades alternativas, se usan isotipos IgG2 e
10 IgG4 cuando el anticuerpo humanizado de la invención se pretende para propósitos terapéuticos y no se requiere la función efectora del anticuerpo. En otras modalidades, la invención abarca anticuerpos humanizados que comprenden una o más modificaciones de aminoácido en la región Fc tal como las descritas en las publicaciones internacionales núms. WO 04/063351, WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89107142, WO 88/07089; publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 2005/0037000; y
15 2005/0064514 y las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 5,843,597 y 5,642,821; las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 10/902,588 (US 20050064514) (presentada el 28 de julio de 2004) y 11/271,140 (US 20060134709) (presentada el 10 de noviembre de 2005); las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. WO 2007/021 841 60/707,419 y WO 2007/106 7017 y las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 5,625,821 y 5,648,260 y la patente europea núm. EP 0 307 434. En una modalidad específica, la modificación de aminoácido de las
20 regiones Fc de los anticuerpos humanizados de la invención con respecto a la región Fc silvestre comprende una sustitución en la posición 243, 292, 300, 305 y 396. En una modalidad preferida, la modificación de aminoácidos de las regiones Fc de los anticuerpos humanizados de la invención con respecto a la región Fc silvestre comprende una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina.

25 Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la invención se unen al dominio extracelular de FcyRIIB humano nativo que se expresa endógenamente en la superficie de la célula. Los anticuerpos anti- FcyRIIB humanizados descritos en la presente pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de una CDR1 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:1, sec. con núm. de ident.:29, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una
30 secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 31-35 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una CDR2 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:2, sec. con núm. de ident.:30, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-66 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una CDR3
35 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:3, sec. con núm. de ident.:31, una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 99-110 como se expone en la sec. con núm. de ident.:60, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 99-110 como se expone en la sec. con núm. de ident.:68) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de una CDR1 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:8, sec. con núm. de ident.:38, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 24-34 como se expone en la
40 sec. con núm. de ident.:62) y/o una CDR2 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:9, sec. con núm. de ident.:10, sec. con núm. de ident.:11, sec. con núm. de ident.:39, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 50-56 como se expone en la sec. con núm. de ident.:62) y/o una CDR3 (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:12, sec. con núm. de ident.:40, o una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 90-98 como se expone en la sec. con núm. de ident.:62).

45 Se describe en la presente un anticuerpo humanizado 2B6, en donde la región VH consiste de los segmentos FR del segmento VH1-18 de VH de la línea germinal humana (Matsuda y otros, 1998, J. Exp. Med 188:2151062) y JH6 (Ravetch y otros, 1981, Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR de 2B6 VH, con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1, sec. con núm. de ident.: 2, o sec. con núm. de ident.: 3. El 2B6 VH puede
50 tener la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 24, sec. con núm. de ident.:60, o sec. con núm. de ident.:68. El anticuerpo 2B6 humanizado puede comprender además una región VL, que consiste de los segmentos FR del segmento VK-A26 de VL de la línea germinal humana (Lautner-Rieske y otros, 1992, Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) y JK4 (Hieter y otros, 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más regiones CDR de 2B6 VL, con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 8, sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de
55 ident.: 11, y sec. con núm. de ident.: 12. En un caso, 2B6 VL tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 18; sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 22, o sec. con núm. de ident.:62. El anticuerpo 2B6 de la invención comprende un VL que comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:62 y un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:68.

60 Se describe además en la presente un anticuerpo humanizado 3H7, en donde la región VH consiste de los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR de la 3H7 VH, con la secuencia de aminoácido de sec. con núm. de ident.: 37. En otra modalidad específica, el anticuerpo humanizado 3H7 comprende además regiones VL, que consisten de los segmentos FR de un segmento VL de la línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7 VL con la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 46.

Se describe en la presente un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente al dominio extracelular del FcγRIIB humano nativo, dicho anticuerpo que comprende (o alternativamente, que consiste de) de las secuencias de CDR de 2B6 o 3H7, en cualquiera de las siguientes combinaciones: una VH CDR1 y una VL CDR1; una VH CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2 y una VL CDR1; VH CDR2 y VL CDR2; una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR3 y una VH CDR1; una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR3 y una VL CDR3; una VH1 CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR1; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VH CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR1; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR2 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR2; una VH CDR1, una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1 y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR2, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; una VH CDR1, una VH CDR3, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; una VH CDR2, una VH CDR3, una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3; o cualquier combinación de éstas de las VH CDR y VL CDR descritas en la presente.

La presente invención proporciona moléculas de anticuerpo humanizado específico para FcγRIIB en la que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) se han sustituido por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donador que se une específicamente a FcγRIIB, con una afinidad mayor que FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6 o 3H7, con números de acceso ATCC PTA-4591, y PTA-4592, respectivamente, o un anticuerpo monoclonal producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. En otras modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención se unen al mismo epítipo como 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. En una modalidad más preferida, el anticuerpo humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo donador murino. Se apreciará por una persona con experiencia en la técnica que la invención abarca generalmente el injerto de CDR de anticuerpos. Así, los anticuerpos donador y aceptor se pueden derivar de animales de la misma especie e incluso de la misma clase o sub-clase de anticuerpo. Más usualmente, sin embargo, los anticuerpos donador y aceptor se derivan de animales de diferentes especies. Típicamente, el anticuerpo donador es un anticuerpo no humano, tal como un MAbs de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunos casos, al menos una CDR del anticuerpo donador se injerta en el anticuerpo humano. En otros casos, al menos dos y preferentemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, bucle estructural de las CDR o una combinación de estos. En algunas modalidades, la invención abarca un anticuerpo humanizado de FcγRIIB que comprende al menos una cadena pesada injertada con CDR y al menos una cadena ligera injertada con CDR.

En una modalidad preferida, las regiones CDR del anticuerpo humanizado específico a FcγRIIB se derivan de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB. En algunos casos, los anticuerpos humanizados descritos en la presente comprenden alteraciones, que incluyen pero sin limitarse a deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, es decir, regiones marco del dominio variable de cadena ligera y/o pesada humana que son necesarias para mantener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas modalidades, las regiones marco de los anticuerpos humanizados descritos en la presente no necesariamente consisten de la secuencia de aminoácido precisa de la región marco de una región variable del anticuerpo humano de origen natural, pero contiene varias alteraciones, que incluyen pero sin limitarse a deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica para el mismo objetivo que el anticuerpo murino específico a FcγRIIB. En las modalidades más preferidas, se hacen un número mínimo de alteraciones a la región marco para evitar las introducciones a gran escala de residuos marco no humanos y para asegurar inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los humanos. El anticuerpo monoclonal donador es preferentemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6 y 3H7 (con números de acceso ATCC PTA-4591, y PTA-4592, respectivamente) que se unen a FcγRIIB o un anticuerpo monoclonal producido por el clon 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 (con números de acceso ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente).

Se describen en la presente anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de la región variable de cadena pesada que comprende los residuos marco del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1,

2H9, 2D11, o 1F2. En un caso específico, el dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos comprende la sec. con núm. de ident.:60. El dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos de la invención comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:68. En otras modalidades, la invención abarca un anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcγRDB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en donde el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de la región variable de cadena ligera que comprende residuos marco del anticuerpo receptor y residuos de anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, *por ejemplo*, el anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2. El dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos de la invención comprende la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:62.

Un anticuerpo humanizado específico a FcγRIIB puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado de la invención comprende además al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente esa de una inmunoglobulina humana. Los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención se pueden seleccionar con respecto a la función propuesta del anticuerpo, particularmente, la función efectora que se puede requerir. En algunas modalidades, los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención son dominios de IgA, IgE, IgG o IgM humana. En una modalidad específica, se usan los dominios constantes de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando los anticuerpos humanizados de la invención se pretenden para usos terapéuticos y se necesitan funciones efectoras de anticuerpos. En modalidades alternativas, se usan isotipos IgG2 e IgG4 cuando el anticuerpo humanizado de la invención se pretende para usos terapéuticos y no se requieren la función efectora del anticuerpo. La invención abarca dominios constantes Fc que comprenden una o más modificaciones aminoácidos que alteran las funciones efectoras de los anticuerpos tales como las descritas en las publicaciones de las solicitudes de patentes de Estados Unidos núms. 2005/0037000 y 2005/0064514; la publicación de solicitud de patente WO 2004/063351. En una modalidad específica, el anticuerpo de la invención comprende un dominio Fc con una leucina en posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305 y una leucina en la posición 396. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención comprende la (s) modificación (es) de aminoácido (s) de la Fc región con respecto a la región Fc silvestre, modificación que comprende una sustitución en la posición 243, 292, 300, 305 y 396, preferentemente una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina y en la posición 396 con leucina.

En algunas modalidades, el anticuerpo humanizado de la invención contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de la cadena pesada. En otras modalidades, el anticuerpo humanizado de la invención puede comprender además uno o más de las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluyen IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. En algunas modalidades, el dominio constante es un dominio constante de fijación al complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado exhibe actividad citotóxica, y la clase es típicamente IgG₁. En otras modalidades, cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG₂. El anticuerpo humanizado de la invención puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y seleccionar dominios constantes determinados particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia ordinaria en la técnica.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder con precisión a las secuencias parentales *por ejemplo*, el CDR o el marco consenso del donador se pueden mutagenizar por sustitución, inserción o deleción de al menos un residuo de manera que el residuo del CDR o marco en el sitio no correspondan ya sea al consenso o al anticuerpo donador. Tales mutaciones, sin embargo, preferentemente no son extensas. Por lo general, al menos el 75% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de la región marco parental (FR) y las secuencias CDR, más frecuentemente 90%, y con la máxima preferencia mayor de 95%. Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, injerto de CDR (patente europea núm. EP 239,400; publicación internacional núm. WO 91/09967; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), recubrimiento o mejora de la superficie (patentes europeas núms. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka y otros, 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; y Roguska y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973), intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos núm. 5,565,332), y técnicas descritas en, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, publicación internacional núm. WO 9317105, Tan y otros, 2002, J. Immunol. 169:1119-25, Caldas y otros, 2000, Protein Eng. 13:353-60, Morea y otros, 2000, Methods 20:267-79, Baca y otros, 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska y otros, 1996, Protein Eng. 9:895-904, Couto y otros, 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto y otros, 1995, Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu, 1994, Gene 150:409-10, Pedersen y otros, 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73, Jones y otros, 1986, Nature 321:522-525, Riechmann y otros, 1988, Nature 332:323, y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Frecuentemente, los residuos marco en las regiones marco serán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos conocidos en la técnica, *por ejemplo*, por el modelado de las interacciones de las CDR y los residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la

unión del antígeno y la comparación de secuencia para identificar los residuos marco inusuales en posiciones particulares. (*Ver, por ejemplo*, Queen y otros, la patente de Estados Unidos núm. 5,585,089; las publicaciones de Estados Unidos núms. 2004/0049014 y 2003/0229208; las patentes de Estados Unidos núms. 6,350,861; 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; y 5,530,101 y Riechmann y otros, 1988, Nature 332:323).

5 En una modalidad particular, los anticuerpos humanizados de la invención, o fragmentos de estos, agonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una modalidad de la invención, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de células B. En otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención inhiben la activación de las células B, proliferación de células B, producción de anticuerpos, entrada de calcio intracelular de las
10 células B, progresión del ciclo celular, o la actividad de una o más moléculas de señalización corriente abajo en la vía de transducción de la señal de FcγRIIB. Todavía en otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención mejoran la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento SHIP. En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos agonistas humanizados inhiben la actividad de la quinasa MAP o el reclutamiento Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de la célula B. En otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una modalidad particular, dichos anticuerpos humanizados inhiben la activación de mastocitos inducida por el FcεRI, movilización de calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención 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 los miembros de la familia MAP quinasa (*por ejemplo*, Erk1, Erk2, JNK, p38, *etc.*). En otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención mejoran la fosforilación de la tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra modalidad, los anticuerpos agonistas humanizados de la invención inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

25 En otra modalidad, los anticuerpos humanizados de la invención, o fragmentos de estos, antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una modalidad, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de células B. En una modalidad particular, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención mejoran la actividad de células B, proliferación de células B, producción de anticuerpos, entrada de calcio intracelular, o actividad de una o más moléculas de señalización corriente abajo en la vía de transducción de señal de FcγRIIB. Todavía en otra modalidad particular, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una modalidad adicional de la invención, los anticuerpos humanizados antagonistas mejoran la actividad quinasa de MAP o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de células B. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En una modalidad particular, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención mejoran la activación de los mastocitos inducidos por FcεRI, movilización del calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, mejoran la activación de los miembros de la familia MAP quinasa (*por ejemplo*, Erk1, Erk2, JNK, p38, *etc.*). Todavía en otra modalidad, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención inhiben la fosforilación de la tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención mejoran la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra modalidad, los anticuerpos humanizados antagonistas de la invención evitan la fagocitosis, depuración de partículas opsonizadas por los macrófagos esplénicos.

45 Los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), y Fvs unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos, fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. Particularmente, los anticuerpos usados en los métodos de la presente invención 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 afinidad mayor que con la que dicha molécula de inmunoglobulina se une a FcγRIIA y/o se une inmunoespecíficamente a FcγRIIB y bloquea el dominio de unión a Fc de FcγRIIB. Los análogos de anticuerpos pueden incluir además receptores de células T específicos a FcγRIIB, por ejemplo, receptores de células T quiméricas (*ver, por ejemplo*, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0043401), un receptor de células T de cadena sencilla enlazada a un anticuerpo de cadena sencilla (*ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,534,633), y las proteínas andamios (*ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,818,418). En ciertas modalidades, un anticuerpo análogo de la invención no es un anticuerpo monoclonal.

60 Los anticuerpos humanizados usados en los métodos de la invención pueden ser de cualquier origen animal, que incluyen aves y mamíferos (*por ejemplo*, humano, primate no humano, murino, burro, oveja, conejo, carnero, conejillo de indias, camello, caballo o pollo). Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en la presente, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulina humana sintética o de ratones que expresan anticuerpos de genes humanos.

Los anticuerpos humanizados usados en los métodos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos se pueden unir inmuno-específicamente a diferentes epítopos de FcγRIIB o se unen inmuno-específicamente tanto a un epítipo de FcγRIIB, así como a un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. *Ver, por ejemplo*, las publicaciones internacionales núms. WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO 92/05793; Tutt, y otros, 1991, J. Immunol. 147:60-69; las patentes de Estados Unidos núms. 4,474,893, 4,714,681, 4,925,648, 5,573,920, y 5,601,819; y Kostelny y otros, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Todorovska y otros, 2001 Journal of Immunological Methods, 248:47-66. En modalidades particulares, los anticuerpos humanizados de la invención son multiespecíficos con especificidades para FcγRIIB y para un antígeno de cáncer o cualquier otro marcador de superficie celular específico para una célula (por ejemplo, una célula inmunitaria tal como una célula T o célula B), diseñado para que se muera, *por ejemplo*, para tratar o evitar una enfermedad o trastorno en particular, o para otros receptores Fc, *por ejemplo*, FcγRIIIA, FcγRIIIB, etc.

Un anticuerpo usado en los métodos descritos en la presente puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este (*por ejemplo*, que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs), preferentemente todos los 6 CDRs) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente (*por ejemplo*, CD3 de la cadena pesada). Un anticuerpo usado en los métodos descritos en la presente se pueden unir al mismo epítipo como el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, ID5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente y/o compete con el anticuerpo monoclonal de ratón producido a partir del clon 2B6, 3H7, ID5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con los números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente como se determinó, *por ejemplo*, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo adecuado, y se une además a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcγRIIA.

Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo algo semejante a esa unión covalente. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se pueden llevar a cabo por técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos humanizados en 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 los sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden hacer por una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. *Ver* además las patentes de Estados Unidos núms. 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones internacionales núms. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Los anticuerpos humanos se pueden producir además usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana se pueden introducir por recombinación homóloga o aleatoriamente en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable, región constante, y región de diversidad humana se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón adicionalmente a los genes de cadena pesada y ligera humana. Los genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera de ratón pueden ser dados no funcional por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica del gen de la región J_H evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se reproducen después para producir crías homocigotas que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan usando metodologías convencionales con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, la totalidad o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados, usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana contenidos por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Así, usando una técnica de ese tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, *ver* Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos humanos monoclonales y los protocolos para producir tales anticuerpos, *ver, por ejemplo*, las publicaciones internacionales núms. WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las patentes de Estados Unidos núms. 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. Adicionalmente,

compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) se pueden contratar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la que se describió anteriormente.

5 Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se 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 métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. *Ver por ejemplo*, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi y otros, 1986, BioTechniques 4:214; Gillies y otros, 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; y las patentes de Estados Unidos núms. 6,311,415, 5,807,715, 10 4,816,567, y 4,816,397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie no-humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de la CDR (EP 239,400; publicación internacional núm. WO 91/09967; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), recubrimiento o mejora de la superficie (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka y otros, 1994, 15 Protein Engineering 7:805; y Roguska y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969), e intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos núm. 5,565,332).

Además, los anticuerpos de la invención se pueden, a su vez, utilizar para generar anticuerpos anti-idiotipo usando técnicas bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. (*Ver, por ejemplo*, Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7:437-444; y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147:2429-2438. La invención proporciona métodos que emplean el uso de 20 polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención o un fragmento de este.

Se describen en la presente anticuerpos de dominio sencillo, que incluyen anticuerpos de dominio sencillo camelizado (*Ver por ejemplo*, Muyldermans y otros, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall y otros, 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann y Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; las publicaciones internacionales núms. WO 94/04678 y WO 94/25591; la patente de Estados Unidos núm. 6,005,07). Además se describen unos anticuerpos de 25 dominio sencillo que comprenden dos dominios VH con modificaciones tal que se forman los anticuerpos de dominio sencillo.

Los métodos de la presente invención abarcan además el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de estos que tienen vidas medias (*por ejemplo*, vidas medias en suero) en un mamífero, preferentemente un humano, de más de 15 días, preferentemente mayor de 20 días, mayor de 25 días, mayor de 30 días, mayor de 35 días, mayor de 40 días, mayor de 45 días, mayor de 2 meses, mayor de 3 meses, mayor de 4 meses o mayor de 5 meses. Las vidas medias 30 aumentadas de los anticuerpos humanizados de la presente invención o fragmentos de estos en un mamífero, preferentemente un humano, resulta en un título de suero más alto de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y así, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reduce la concentración que se administra de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos o fragmentos de estos con vidas medias *in vivo* aumentadas se pueden generar por técnicas conocidas por aquellos con 35 experiencia en la técnica. Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de estos con vidas medias *in vivo* aumentadas se pueden generar modificando (*por ejemplo*, sustitución, delección o adición) residuos de aminoácidos identificados como involucrados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden modificar por ingeniería genética por los métodos descritos en Ward y otros para aumentar las vidas medias biológicas (*Ver la patente de Estados Unidos núm. 6,277,375 B1*). Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la 40 invención se pueden modificar por ingeniería genética en el dominio de la bisagra con Fc para tener vidas medias en suero o *in vivo* aumentadas.

Los anticuerpos o fragmentos de estos con vidas medias *in vivo* aumentadas se pueden generar por la fijación de moléculas de polímero tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. El PEG se puede unir a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica al sitio del PEG al N- o C-terminal de dichos anticuerpos o 45 fragmentos de anticuerpos o a través de los grupos amino épsilon presentes en los residuos de lisina. La derivatización del polímero lineal o ramificado que resulta en la pérdida mínima de actividad biológica se podrá usar. El grado de conjugación se controlará estrechamente por SDS PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG por, *por ejemplo*, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden además modificar por los métodos y agentes de acoplamiento descritos por Davis y otros (*Ver la patente de Estados Unidos núm. 4,179,337*) para proporcionar composiciones que se 50 pueden inyectar en el sistema circulatorio de los mamíferos sin sustancialmente respuesta inmunogénica.

La presente invención además abarca el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos de la invención con mutaciones (*por ejemplo*, una o más sustituciones de aminoácidos) en regiones marco o CDR. Preferentemente, las mutaciones en estos anticuerpos humanizados mantienen o mejoran la avidéz y/o afinidad de los anticuerpos para CD32B al que se unen 55

inmuno específicamente. Las técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (*por ejemplo*, inmunoensayos) se pueden usar para ensayar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

5 La invención abarca la modificación de residuos marco de los anticuerpos humanizados de la invención. Los residuos marco en las regiones marco se pueden sustituir con el correspondiente residuo del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, por modelado de las interacciones de las CDR y residuos marco para identificar los residuos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencia para identificar los residuos marco inusuales en posiciones particulares. (*Ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5,585,089; y Riechmann y otros, 1988, Nature 332:323).

10 La invención abarca un anticuerpo humanizado que tiene fenilalanina en el aminoácido número 21 de la región 1 marco del dominio variable de la cadena ligera (correspondiente al aminoácido número 21 de sec. con núm. de ident.:62). En otros casos se describe en la presente un anticuerpo humanizado que tiene una o más de una isoleucina en el aminoácido número 13 de la región 2 marco del dominio variable de la cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 48 de la sec. con núm. de ident.:60), una valina en el aminoácido número 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 72 de la sec. con núm. de ident.:60), una valina en el aminoácido número 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 73 de la sec. con núm. de ident.:60), una valina en el aminoácido número 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 74 de la sec. con núm. de ident.:60), o cualquier combinación de éstas.

20 La invención abarca un anticuerpo humanizado que tiene una o más de una isoleucina en el aminoácido número 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 48 de la sec. con núm. de ident.:68), una valina en el aminoácido número 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 72 de la sec. con núm. de ident.:68), un ácido aspártico en el aminoácido número 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 73 de la sec. con núm. de ident.:68), una treonina en el aminoácido número 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada (correspondiente al aminoácido número 74 de la sec. con núm. de ident.:68). En algunos casos se describen en la presente anticuerpos humanizados, que comprenden al menos una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, inserción, delección, sustitución) en una o más de las regiones marco del dominio variable de la cadena ligera.

25 La invención abarca un anticuerpo humanizado que comprende una modificación en el aminoácido 21 de la región 1 marco del dominio variable de cadena ligera, cuya modificación es preferentemente una sustitución con fenilalanina (correspondiente al aminoácido número 21 en la sec. con núm. de ident.:62). En otros casos existen se describen en la presente anticuerpos humanizados que comprende al menos una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, inserción, delección, sustitución) en una o más de las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada. En unos ejemplos específicos de acuerdo con este caso, se describen en la presente un anticuerpo humanizado que comprende una modificación en el aminoácido 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es una sustitución con isoleucina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 48 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada cuya modificación es una sustitución con valina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 72 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es una sustitución con valina (*por ejemplo*, correspondiente al aminoácido número 73 en la sec. con núm. de ident.:60), y/o una modificación en el aminoácido 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es una sustitución con valina (*por ejemplo*, que corresponde al aminoácido número 74 en la sec. con núm. de ident.:60).

30 La invención abarca un anticuerpo humanizado que comprende una modificación en el aminoácido 13 de la región 2 marco del dominio variable de cadena pesada cuya modificación es una sustitución con isoleucina (correspondiente al aminoácido número 48 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 6 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada, cuya modificación es una sustitución con valina (correspondiente al aminoácido número 72 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 7 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada cuya modificación es una sustitución con ácido aspártico (correspondiente al aminoácido número 73 en la sec. con núm. de ident.:68), y/o una modificación en el aminoácido 8 de la región 3 marco del dominio variable de cadena pesada cuya modificación es una sustitución con treonina (correspondiente al aminoácido número 74 en la sec. con núm. de ident.:68). Se describe además en la presente cualquier combinación de las modificaciones de aminoácidos anteriores en las regiones marco del dominio variable de la cadena pesada o ligera.

35 La presente invención abarca anticuerpos humanizados que comprenden modificaciones preferentemente, en la región Fc que modifica la afinidad de unión del anticuerpo a uno o más FcγR. Los métodos para modificar anticuerpos con unión modificada a uno o más FcγR se conocen en la técnica, *ver, por ejemplo*, las publicaciones internacionales núms. WO 04/063351, WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089; Publicación de Estados Unidos con núms. de serie 2005/0037000; y 2005/0064514 y las patentes de Estados Unidos núms. 5,843,597 y 5,642,821. La invención abarca cualquiera de las mutaciones descritas en las publicaciones internacionales núms. WO 04/063351, WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089; las publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 2005/0037000; y 2005/0064514 y las patentes de Estados Unidos núms. 5,843,597 y 5,642,821. La invención abarca además cualquiera de las mutaciones descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 10/902,588 (US 20050064514) (presentada el 28 de julio de 2004) y 11/271,140 (US 20060134709) (presentada el 10 de noviembre de 2005), y la publicación de la solicitud de patente núm. US 2007/021841. En algunas modalidades,

la invención abarca anticuerpos que tienen alterada la afinidad por un FcγR de activación, *por ejemplo*, FcγRIIIA. Preferentemente, tales modificaciones además tienen una función efectora alterada mediada por Fc. Las modificaciones que afectan la función efectora mediada por Fc son bien conocidas en la técnica (Ver la patente de Estados Unidos núm. 6,194,551). En una modalidad específica, los aminoácidos que se puede modificar de acuerdo con el método de la invención incluyen, pero sin limitarse a, Prolina 329, Prolina 331, y Lisina 322. En ciertas modalidades, Prolina 329, Prolina 331 y Lisina 322 se sustituyen con alanina; sin embargo, se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido. Ver la publicación internacional núm.: WO 00/42072 y la patente de Estados Unidos núm. 6,194,551. En modalidades preferidas, los aminoácidos que se modifican de acuerdo con los métodos de la invención comprenden los aminoácidos en las posiciones 243, 292, 300, 305 y 396; en un ejemplo específico de acuerdo con esta modalidad, los aminoácidos que se modifican son fenilalanina 243, arginina 292, tirosina 300, valina 305 y prolina 396, y se sustituyen preferentemente con leucina, prolina, leucina, isoleucina y leucina, respectivamente.

En una modalidad particular, la modificación de la región Fc comprende una o más mutaciones en la región Fc. Una o más mutaciones en la región Fc pueden resultar en un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpos alterada, una unión alterada a otros receptores Fc (*por ejemplo*, receptores de activación Fc), una actividad ADCC alterada, una actividad de unión a C1q alterada, una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento alterada, una actividad fagocítica alterada, o cualquier combinación de estas.

La invención proporciona además anticuerpos humanizados con contenido de oligosacáridos alterado. Los oligosacáridos, como se usan en la presente, se refieren a los carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples y los dos términos se pueden usar de manera intercambiable en la presente. Las porciones de carbohidrato de la presente invención serán descritas con referencia a la nomenclatura usada comúnmente en la técnica. Para una revisión de la química de los carbohidratos, *ver, por ejemplo*, Hubbard y otros, 1981 Ann. Rev. Biochem., 50: 555-583, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. 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 por la notación abreviada NeuNAc para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para 5-glicolneuramínico.

Generalmente, los anticuerpos contienen porciones de carbohidrato en las posiciones conservadas en la región constante de la cadena pesada, y hasta 30% de las IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. La IgG tiene una estructura sencilla de carbohidratos biantenarico con enlace N en Asn 297 el cual radica en el dominio CH2 (Jefferis y otros, 1998, Immunol. Rev. 163: 59-76; Wright y otros, 1997, Trends Biotech 15: 26-32). La IgG humana típicamente tiene un carbohidrato de la siguiente estructura; GlcNAc (fucosa)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)₂. Sin embargo variaciones entre las IgG en el contenido de carbohidratos ocurren lo que conduce a la función alterada, *ver, por ejemplo*, Jassal y otros, 2001 Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 243-9; Groenink y otros, 1996 J. Immunol. 26: 1404-7; Boyd y otros, 1995 Mol. Immunol. 32: 1311-8; Kumpel y otros, 1994, Human Antibody Hybridomas, 5: 143-51. La invención abarca anticuerpos humanizados que comprenden una variación en la porción de carbohidrato que se une a Asn 297. En una modalidad, la porción de carbohidrato tiene una galactosa y/o galactosa-ácido siálico en una o ambas GlcNAc terminal y/o un tercer brazo GlcNAc (GlcNAc bisectados).

En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención están sustancialmente libres de uno o más grupos seleccionados de azúcar, *por ejemplo*, 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 se puede preparar usando métodos comunes conocidos por uno con experiencia en la técnica, que incluyen, por ejemplo, producción de forma recombinante de un anticuerpo de la invención en una célula huésped que es defectuosa en la adición de los grupo(s) de azúcar seleccionado(s) para la porción de carbohidrato del anticuerpo, tal que aproximadamente 90-100% del anticuerpo en la composición carece del grupo(s) azúcar seleccionado(s) unido a la porción de carbohidrato. Los métodos alternativos para preparar tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, cultivar células bajo condiciones que evitan o reducen la adición de uno o más grupos de azúcar seleccionados o eliminación post-traduccional de uno o más grupos de azúcar seleccionados.

Se describe en la presente un método para producir una preparación de anticuerpo sustancialmente homogénea, en donde aproximadamente 80-100% del anticuerpo en la composición carece de fucosa en su porción de carbohidrato *por ejemplo*, la unión de carbohidrato en Asn 297. El anticuerpo se puede preparar, por ejemplo, por (a) el uso de una célula huésped modificada por ingeniería genética que es deficiente en el metabolismo de fucosa tal que tiene una capacidad reducida para las proteínas fucosiladas expresadas en la misma; (b) cultivo de las células en condiciones que evitan o reducen la fucosilación; (c) eliminación post-traduccional de fucosa, *por ejemplo*, con una enzima fucosidasa; o (d) purificación del anticuerpo para seleccionar el producto que no se fucosila. Con la máxima preferencia, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado se expresa en una célula huésped que tiene una capacidad reducida para fucosilar el anticuerpo expresado en la misma. Preferentemente, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino deficiente en dihidrofolato reductasa (CHO), *por ejemplo*, una célula CHO Lec 13 (línea celular mutante CHO resistente a lectina, (*ver, por ejemplo*, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0115614; la publicación PCT núm. WO 00/61739; la solicitud de patente Europea EP 1 229 125; Ribka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1): 51-62; Ripka y otros, 1986 Arch. Biochem. Biophys. 249(2): 533-45), o una célula CHO-K1, una célula DUX-B11, una célula CHO-DP12 o una célula CHO-DG44, la que se ha modificado de manera que el anticuerpo

no se fucosile sustancialmente. Así, la célula puede mostrar expresión y/o actividad alterada de la enzima fucosiltransferasa, u otra enzima o sustrato implicado en la adición de fucosa al oligosacárido con enlace N de manera que la enzima tiene una actividad disminuida y/o nivel de expresión reducido en la célula. Para los métodos de producir anticuerpos con un contenido alterado de fucosa, *ver, por ejemplo*, WO 03/035835 y Shields y otros, 2002, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40.

En algunas modalidades, las modificaciones de carbohidratos alterados modulan uno o más de lo siguiente: solubilización del anticuerpo, facilitación del transporte subcelular y secreción del anticuerpo, promoción del ensamblaje de anticuerpos, integridad conformacional y función efectora mediada por anticuerpo. En una modalidad específica las modificaciones de carbohidratos alterados mejoran la función efectora mediada por anticuerpo respecto al anticuerpo que carece de la modificación de carbohidrato. Las modificaciones de carbohidrato que conducen a la función efectora alterada mediada por anticuerpo son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, *ver* Shields R.L. y otros, 2001, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40; Davies J. y otros, 2001, Biotechnology & Bioengineering, 74(4): 288-294. En otra modalidad específica, las modificaciones de carbohidratos alterados mejoran la unión de los anticuerpos de la invención al receptor FcγRIIB. Alterar las modificaciones de carbohidrato de acuerdo con los métodos de la invención incluye, por ejemplo, aumentar el contenido de carbohidrato del anticuerpo o disminuir el contenido de carbohidrato del anticuerpo. Los métodos para alterar los contenidos de carbohidrato son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, *ver, por ejemplo*, Wallick y otros, 1988, Journal of Exp. Med 168(3): 1099-1109; Tao y otros, 1989 Journal of Immunology, 143(8): 2595-2601; Routledge y otros, 1995 Transplantation, 60(8): 847-53; Elliott y otros 2003; Nature Biotechnology, 21: 414-21; Shields y otros 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(30): 26733-40.

En algunas modalidades, la invención abarca anticuerpos humanizados que comprenden uno o más sitios de glicosilación, de manera que una o más porciones de carbohidrato se unen covalentemente al anticuerpo. En otras modalidades, la invención abarca anticuerpos humanizados que comprenden uno o más sitios de glicosilación y una o más modificaciones en la región Fc, tales como las descritas *arriba* y las conocidas por uno con experiencia en la técnica. En modalidades preferidas, una o más modificaciones en la región Fc mejoran la afinidad del anticuerpo para un FcγR de activación, *por ejemplo*, FcγRIIIA, respecto al anticuerpo que comprende las regiones Fc silvestre. Los anticuerpos humanizados de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpo mejorada, *por ejemplo*, actividad ADCC mejorada. En algunas modalidades, la invención comprende además los anticuerpos humanizados que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que directamente o indirectamente se conocen por interactuar con una porción de carbohidrato del anticuerpo, que incluyen, pero sin limitarse a, aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, y 301. Los aminoácidos que interactúan directamente o indirectamente con una porción de carbohidrato de un anticuerpo se conocen en la técnica *ver, por ejemplo*, Jefferis y otros, 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

La invención abarca los anticuerpos humanizados que se han modificado por la introducción de uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferentemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, *por ejemplo*, la actividad de unión a FcγRIIB. Los sitios de glicosilación se puede introducir en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invención. Como se usa en la presente, "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácido específica en un anticuerpo para el cual un oligosacárido (*es decir*, carbohidrato, con dos o más azúcares simples unidos entre sí) se unirá específicamente y covalentemente. Las cadenas laterales de oligosacáridos se enlazan típicamente a la cadena principal de un anticuerpo a través de cualquier enlazamiento N u O. La glicosilación con enlace N se refiere a la unión de una porción de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación con enlace O se refiere a la unión de una porción de oligosacárido a un ácido hidroxiamino, *por ejemplo*, serina, treonina. Los anticuerpos de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, que incluyen sitios de glicosilación con enlace N y con enlace O. Cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación con enlace N y con enlace O conocido en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención. Un sitio de glicosilación con enlace N ilustrativo que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención, es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Un sitio o sitios de ese tipo se puede introducir en un anticuerpo de la invención usando métodos bien conocidos en la técnica a la que pertenece esta invención. *Ver*, por ejemplo, "In Vitro Mutagenesis," Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, y otros W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116. Un método ilustrativo para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que se obtenga la secuencia deseada Asn-X-Thr/Ser.

En algunas modalidades específicas, la invención abarca anticuerpos humanizados de FcγRIIB modificados en donde el sitio de N-glicosilación consenso Asn₅₀-Val-Ser de la región CDR2 se ha modificado, de manera que se elimine el sitio de glicosilación en la posición 50. Aunque no pretende estar limitado por un mecanismo de acción particular, la eliminación del sitio de glicosilación puede limitar la variación potencial en la producción del anticuerpo, así como la inmunogenicidad potencial en una aplicación farmacéutica. En una modalidad específica, la invención abarca un anticuerpo humanizado de FcγRIIB en donde el aminoácido en la posición 50 se ha modificado, *por ejemplo*, delecionado o sustituido. En otra modalidad específica, la invención abarca, además, una modificación de aminoácidos, *por ejemplo*, deleción o sustitución, en la posición 51. En una modalidad específica, la invención abarca un anticuerpo humanizado de FcγRIIB en donde el aminoácido en la posición 50 se ha sustituido por tirosina. En otra modalidad más

específica, la invención abarca el anticuerpo humanizado de Fc γ RIIB en donde el aminoácido en la posición 50 se ha sustituido con tirosina y el aminoácido en la posición 51 se ha sustituido con alanina.

5 Se describen en la presente los métodos para modificar el contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención añadiendo o eliminando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos se conocen bien en la técnica y se abarcan por la invención, *ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,218,149; EP 0 359 096 B1; la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. US 2002/0028486; WO 03/035835; la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0115614; la patente de Estados Unidos núm. 6,218,149; la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 6,472,511. Además se describen métodos para modificar el
10 contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención mediante la delección de uno o más porciones de carbohidrato endógeno del anticuerpo.

Se describen en la presente métodos para modificar una función efectora de un anticuerpo de la invención, en donde el método comprende modificar el contenido de carbohidrato del anticuerpo usando los métodos descritos en la presente o
15 conocidos en la técnica.

Las técnicas estándar conocidas por aquellos con experiencia en la técnica se pueden usar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento de este, que incluyen, *por ejemplo*, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que resulta en sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los
20 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, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto al anticuerpo original o fragmento de este. En una modalidad preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativos hechos en uno o más residuos previstos de aminoácidos no esenciales.

En este documento se describen anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácido de la cadena pesada variable y/o cadena
25 ligera de anticuerpo monoclonal de ratón producida por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. El anticuerpo humanizado o fragmentos del mismo puede comprender una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:70 y/o cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:66. Además en la presente se describen anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a Fc γ RIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o fragmento de este se une a Fc γ RIIA y/o se une a Fc γ RIIB y bloquea el dominio de unión a Fc de Fc γ RIIB, dichos fragmentos de anticuerpos o anticuerpo comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDRs que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al
30 menos 99% idéntico a la secuencia de aminoácido de una o más CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón producida por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por cualquier método conocido por aquel con experiencia en la técnica, que incluyen las búsquedas BLAST de proteínas.

Se describe en la presente el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a Fc γ RIIB con afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de este se unen a Fc γ RIIA y/o se unen a Fc γ RIIB y bloquean el dominio de unión a Fc de Fc γ RIIB, en donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se codifican por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con la secuencia de nucleótido del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente bajo condiciones rigurosas. Se describe en la presente además el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a Fc γ RIIB con afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a Fc γ RIIA y/o se unen a Fc γ RIIB y bloquean el dominio de unión a Fc de Fc γ RIIB, en donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se codifican por una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena pesada o la cadena pesada completa de un anticuerpo humanizado 2B6 de la invención *por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:67 o sec. con núm. de ident.:69, respectivamente. Se describe en la presente además el uso de anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a Fc γ RIIB con afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a Fc γ RIIA y/o se unen a Fc γ RIIB y bloquean el dominio de unión a Fc de Fc γ RIIB, en donde dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se codifican por una secuencia de nucleótidos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de la cadena ligera o la cadena ligera de un anticuerpo humanizado 2B6 de la invención *por ejemplo*, sec. con núm. de ident.:61 o sec. con núm. de ident.:65, respectivamente. Se describe en la presente además anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a Fc γ RIIB con afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a Fc γ RIIA, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable
45
50
55
60
65

codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena variable ligera y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, bajo condiciones rigurosas. En otra modalidad preferida, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos o fragmentos de estos se unen a FcγRIIA, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una o más CDRs codificadas por una secuencia de nucleótidos de una o más CDRs del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con número de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero sin limitarse a, hibridación con ADN unido a filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0.2 X SSC/0.1% de SDS a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como la hibridación a ADN unido filtro en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0.1 X SSC/0.2% de SDS a aproximadamente 60 °C, o cualquier otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por aquellos con experiencia en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel, F.M. y otros, eds. 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 a 6.3.6 y 2.10.3).

6.1.1 Conjugados de anticuerpo

La presente invención abarca anticuerpos humanizados fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (que incluyen tanto conjugaciones de manera covalente y no covalente) a polipéptidos heterólogos (*es decir*, un polipéptido no relacionado; o porción de este, 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 obligatoriamente no necesita ser directa, pero puede ocurrir a través de secuencias enlazadoras. Los anticuerpos humanizados se pueden usar por ejemplo para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos de células particulares, ya sea *in vitro* o *in vivo*, fusionando o conjugando los anticuerpos a anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particular. Los anticuerpos fusionados o conjugados a los polipéptidos heterólogos se pueden además usar en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. *Ver por ejemplo*, la publicación del PCT núm. WO 93/21232; EP 439,095; Naramura y otros, 1994 Immunol. Lett., 39:91-99; la patente de Estados Unidos núm. 5,474,981; Gillies y otros, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:1428-1432; y Fell y otros, 1991, J. Immunol., 146:2446-2452.

Además, un anticuerpo humanizado se puede conjugar a un agente terapéutico o porción de fármaco que modifica una determinada respuesta biológica. Los agentes terapéuticos o porciones de fármacos no han de interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee 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 de la difteria, ricina, gelonina y proteína antiviral de fitolaca una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, 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 (*por ejemplo*, TNF-α, TNF-β, AIM I como se describe en la Publicación PCT núm. WO 97/33899), AIM II (*ver, por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi y otros, 1994 J. Immunol., 6:1567-1574), y VEGI (Publicación PCT núm. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (*por ejemplo*, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, una linfoquina (*por ejemplo*, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (*por ejemplo*, hormona del crecimiento ("GH")); proteasa o ribonucleasa.

Los anticuerpos humanizados se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En modalidades preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el comercio. Como se describe en Gentz y otros, 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina se proporciona para una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero sin limitarse a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y otros, 1984 Cell, 37:767) y la etiqueta "flag" (Knappik y otros, 1994 Biotechniques, 17(4): 754-761).

La presente invención incluye además composiciones que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados a fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos se pueden fusionar o conjugar a un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, o porción de este. Los métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos a las porciones de anticuerpo son conocidos en la técnica. *Ver, por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, y 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; las publicaciones internacionales núms. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88: 10535-10539; Zheng y otros, 1995, J. Immunol, 154:5590-5600; y Vil y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89:11337- 11341

5 Proteínas adicionales de fusión se pueden generar a través de las técnicas de transposición de gen, transposición de motivo, transposición de exón y/o transposición de codón (colectivamente referido como "transposición de ADN"). La transposición de ADN se puede emplear para alterar las actividades de los anticuerpos de la invención o fragmentos de estos (*por ejemplo*, anticuerpos o fragmentos de estos con afinidades superiores y velocidades de disociación inferiores). *Ver*, generalmente, las patentes de Estados Unidos núms. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; y 5,837,458, y Patten y otros, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, y otros, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Los anticuerpos o fragmentos de estos, o los anticuerpos o fragmentos de estos codificados, se pueden alterar por ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propenso a error, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos previos a la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, cuyas porciones se unen específicamente a FcγRIIB pueden estar recombinado con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, *etc.* de una o más moléculas heterólogas.

15 La presente invención abarca además anticuerpos humanizados conjugados a un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula a las que se desea aumentar la vida media en suero. Los anticuerpos humanizados se pueden usar de forma diagnóstica para, *por ejemplo*, controlar el desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, *por ejemplo*, determinar la eficacia de un régimen determinado de tratamiento. La detección se puede facilitar acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar ya sea directamente al anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, *por ejemplo*, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. *Ver*, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para el uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Tal diagnóstico y la detección se puede lograr mediante el acoplamiento del anticuerpo a las sustancias detectables que incluyen, pero sin limitarse a, varias enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; complejos de grupo prostético tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, dansyl cloruro o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminescentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina, y aequorina; material radiactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (²¹³Bi), carbono (¹⁴C), cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), lantano (¹⁴⁰La), lutecio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Pr), promecio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutenio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe), iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), itrio (⁹⁰Y), cinc (⁶⁵Zn); metales emisores de positrones usando varias tomografías de emisión de positrones, y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

40 Un anticuerpo se puede conjugar a una porción terapéutica tal como una citotoxina (*por ejemplo*, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radioactivo (*por ejemplo*, emisores alfa, emisores gamma, *etc.*). Las citotoxinas o 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, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos o homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (*por ejemplo*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (*por ejemplo*, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y el platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ejemplo*, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (*por ejemplo*, vincristina y vinblastina).

55 Además, un anticuerpo humanizado se puede conjugar a porciones terapéuticas tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (*ver* anteriormente para los ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas modalidades, el quelante macrocíclico es 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) que se puede unir al anticuerpo a través de una molécula enlazadora. Las moléculas enlazadoras de ese tipo son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo y otros, 1998, *Clin Cancer Res.* 4:2483-90; Peterson y otros, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10:553; y Zimmerman y otros, 1999, *Nucl. Med Biol.* 26:943-50.

60 Las técnicas para conjugar tales porciones terapéuticas con los conjugados son bien conocidas; *ver, por ejemplo*, Amon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y otros (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), 1987, págs. 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 otros (eds.), 1985, págs. 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 otros (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe y otros, Immunol. Rev., 62:119-58, 1982:

5

Un anticuerpo o fragmento de este, se puede usar como un agente terapéutico con o sin una porción terapéutica conjugada a él, administrada solo o en conjunto con factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s).

10

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980.

Los anticuerpos se pueden unir además a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno objetivo. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

15

6.2 preparación de anticuerpos humanizados de FCγRIIB

20

La invención abarca secuencia de nucleótidos que codifican cadenas pesadas y ligeras injertadas con CDR de los anticuerpos de la invención, vectores de clonación y expresión que contienen las secuencias de nucleótidos, células huésped transformadas con las secuencia de nucleótidos, y métodos para la producción de las cadenas injertadas con CDR y moléculas de anticuerpo que comprenden la secuencia de nucleótidos en las células huésped transformadas. Se describen en el presente documento la secuencia de nucleótidos de sec. con núms. de ident.: 17, 19, 21 23, 36 o 45.

25

Se describen en la presente las secuencias de aminoácidos de donadores, que codifican anticuerpos que se unen a FCγRIIB con una afinidad mayor que FCγRIIA, tales como las descritas en la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/403,366, presentada el 14 de agosto de 2002 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0185045, las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. En un caso específico, la secuencia de aminoácido del donador codifica para el anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, u otro anticuerpos monoclonales producidos por métodos de inmunización de la invención y descrito en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0185045. Se describen además en la presente los polinucleótidos que codifican para las secuencias de aminoácidos donadoras que hibridan bajo varias rigurosidades, *por ejemplo*, alto rigurosidad, condiciones de rigurosidad intermedia o baja, con los polinucleótidos que codifican para el anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 286, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2, con números de acceso a la ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, u otros anticuerpos monoclonales producidos por métodos de inmunización de la invención como se describe en la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/403,366, presentada el 14 de agosto de 2002 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0185045. La hibridación se puede realizar bajo diversas condiciones de rigurosidad. En forma de ejemplo y sin limitación, los procedimientos que usan condiciones de baja rigurosidad son los siguientes (ver *además* Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 78, 6789-6792). Los filtros que contienen ADN se tratan previamente durante 6 horas a 40 °C en una solución que contiene 35% de formamida, 5X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM de EDTA, 0.1% de PVP, 0.1% de Ficoll, 1% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma solución con las modificaciones siguientes: 0.02% de PVP, 0.02% de Ficoll, 0.2% de BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, 10% (p/v) de sulfato de dextrano, y se usa 5-20 X 10⁶ cpm de sonda marcada con P³². Los filtros se incuban en la mezcla de hibridación durante 18-20 horas a 40 °C, y se lavan después durante 1.5 horas a 55 °C en una solución que contiene 2X SSC, 25 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM de EDTA, y 0.1% de SDS. La solución de lavado se sustituye con solución fresca y se incuba 1.5 h más a 60 °C. Los filtros se secan y exponen para la autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68 °C y re-exponen a la película. Otras condiciones de baja rigurosidad que se pueden usar son bien conocidos en la técnica (*por ejemplo*, como las que se emplean para las hibridaciones entre especies). En forma de y no de limitación, los procedimientos que usan condiciones de alta rigurosidad son los que siguen. La prehibridación de los filtros que contienen ADN se lleva a cabo durante 8 h a toda la noche a 65 °C en tampón compuesto de 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM de EDTA, 0.02% de PVP, 0.02% de Ficoll, 0.02% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. 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 desnaturalizado y 5-20 X 10⁶ cpm de sonda marcada con P³². El lavado de los filtros se hace a 37 °C durante 1 h en una solución que contiene 2X SSC, 0.01% de PVP, 0.01% de Ficoll, y 0.01% de BSA. Esto es seguido por un lavado en 0.1 x SSC a 50 °C durante 45 min antes de la autorradiografía. Otras condiciones de alta rigurosidad que se pueden usar son bien conocidos en la técnica. La selección de condiciones adecuadas para tales rigurosidades son bien conocidas la técnica (*ver por ejemplo*, Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *ver además*, Ausubel y otros, editores, en Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley y Sons, Inc.; *ver especialmente*, Dyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis," En: Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Vol. 2, T.A. Brown, ed., págs. 111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford,

60

Reino Unido. Los polinucleótidos se pueden obtener, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinar, por cualquier método conocido en la técnica.

5 Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos aceptor se pueden obtener por cualquier método conocido por uno con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican para secuencias humanas del marco aceptor preferidas incluyen, pero sin limitarse a segmentos FR del segmento VH1-8 y JH6 de VH de la línea germinal humana y segmento VK-A26 y JK4 de VL de la línea germinal humana.

10 Una o más de las CDR se pueden insertar dentro de las regiones marco usando técnicas de ADN recombinante de rutina. Las regiones marco pueden ser de origen natural o regiones marco consenso y preferentemente regiones marco humana (*ver, por ejemplo*, Chothia y otros, 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479 para una lista de las regiones marco humana Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y CDRs codifica un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB con afinidad mayor que la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA. Preferentemente, como se discutió *arriba*, uno o más sustituciones de aminoácidos pueden hacerse dentro de las regiones marco, y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión de los anticuerpos de la invención a FcγRIIB.

20 Las bibliotecas humanas o cualquier otras bibliotecas disponibles en la técnica, se pueden tamizar por técnicas estándar conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención.

25 Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica útil para la producción de polipéptidos *por ejemplo*, síntesis *in vitro*, producción de ADN recombinante. Preferentemente, los anticuerpos humanizados se producen por tecnología de ADN recombinante. Los anticuerpos humanizados específicos a FcγRIIB de la invención se pueden producir usando tecnología de expresión de inmunoglobulinas recombinantes. La producción recombinante de moléculas de inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos humanizados se describe en la patente de Estados Unidos núm. 4,816,397 (Boss y otros), las patentes de Estados Unidos núms. 6,331,415 y 4,816,567 (ambas para Cabilly y otros), la patente de GB GB 2,188,638 (Winter y otros), y la patente de GB 2,209,757. Las técnicas para la expresión recombinante de inmunoglobulinas, incluyendo inmunoglobulinas humanizadas, también se pueden encontrar, en Goeddel y otros, Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991), y Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992). Información adicional relativa a la generación, diseño y expresión de anticuerpos recombinantes se puede encontrar en Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993).

35 Un proceso ilustrativo para la producción de los anticuerpos humanizados recombinantes de la invención puede comprender lo siguiente: a) construir, por métodos de biología molecular convencionales, un vector de expresión que comprende un operón que codifica una cadena pesada de anticuerpo en la que las CDRs y una porción mínima del marco de la región variable que se requieren para mantener la especificidad de unión del anticuerpo donador se derivan de una inmunoglobulina no humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino FcγRIIB, y el resto del anticuerpo se deriva de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo un vector para la expresión de una cadena pesada del anticuerpo humanizado; b) construir, por métodos convencionales de biología molecular, un vector de expresión que comprende un operón que codifica una cadena ligera de anticuerpo en la que las CDRs y una porción mínima del marco de la región variable se requieren para mantener la especificidad de unión del anticuerpo donador se derivan de una inmunoglobulina no-humana, tal como el anticuerpo monoclonal murino FcγRIIB, y el resto del anticuerpo se deriva de una inmunoglobulina humana, produciendo de este modo un vector para la expresión de la cadena ligera del anticuerpo humanizado; c) transferir los vectores de expresión a la célula huésped por métodos convencionales de biología molecular para producir una célula huésped transfectada para la expresión de anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados; y d) cultivar la célula transfectada por técnicas de cultivo celular convencionales para producir anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados. Las células huésped se pueden cotransfectar con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que contiene un operón que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo que contiene un operón que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables diferentes pero, son preferentemente idénticos con la excepción de las secuencias que codifican cadena pesada y ligera. Este procedimiento establece la igualdad de expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un único vector se puede usar, que codifica los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Las secuencias que codifican para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico o ambos. La célula huésped usada para expresar el anticuerpo recombinante de la invención puede ser ya sea una célula bacteriana tal como *Escherichia coli*, o preferentemente una célula eucariota. Preferentemente, se pueden usar una célula de mamífero tales como una célula de ovario de hámster chino o células HEK-293. La elección del vector de expresión depende de la elección de la célula huésped, y se puede seleccionar de manera que tenga la expresión deseada y las características reguladoras en la célula huésped seleccionada. Otras líneas celulares que se pueden usar incluyen, pero sin limitarse a, CHO-K1, NSO, y PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos).

60 El método para producir un anticuerpo humanizado de FcγRIIB 2B6 puede comprender lo siguiente: el ARN de las células de hibridoma de 2B6 se convierte a ADNc y los segmentos VL y VH se amplifican por PCR usando, por ejemplo, el estuche RLM-RACE (Ambion, Inc.). Se usan iniciadores específicos del gen para la VH. Los ejemplos de tales iniciadores para VH incluyen: SJ15R, sec. con núm. de ident.: 47 (5' GGT CAC TGT CAC TGG CTC AGG G 3') y

SJ16R, sec. con núm. de ident.: 48 (5' AGG CGG ATC CAG GGG CCA GTG GAT AGA C 3'), y para VL incluyen SJ17R, sec. con núm. de ident.: 49 (5' GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TG 3') y SJ18R, sec. con núm. de ident.: 50 (5' CGG CGG ATC CGA TGG ATA CAG TTG GTG CAG CAT C 3'). El producto RACE se inserta en un plásmido *por ejemplo*, pCR2.1-TOPO usando el estuche de clonación TOPO TA (Invitrogen, Inc.). Los plásmidos resultantes se someten a secuenciación de ADN para determinar las secuencias VH y VL de 2B6. Las secuencias resultantes se traducen y la secuencia de aminoácidos prevista se determinan para cada uno. A partir de estas secuencias el marco (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) se identificadas como se definen por Kabat. La VH de ratón se une después a la región constante C-Gammal humana y una secuencia líder de Ig y se inserta en pCI-Neo para la expresión en mamífero. La VL de ratón se une al segmento C-kappa humano y una secuencia líder de Ig y se clona después en pCI-Neo para la expresión en mamífero. El 2B6 VH humanizado consiste de los segmentos FR a partir del segmento VH1-18 y JH6 de VH de la línea germinal humana, y las regiones CDR de 2B6 VH. El 2B6 VL humanizado consiste de los segmentos FR del segmento VK-A26 y JK4 de VL de la línea germinal humana, y las regiones CDR de 2B6 VL. Los segmentos VH y VL humanizados se ensamblan *de novo* a partir de oligonucleótidos combinados y amplificados por PCR. El fragmento resultante se combina después por PCR con una secuencia líder y el segmento de región constante adecuado se clona en el vector de expresión pCI-neo. La secuencia de ADN de los plásmidos resultantes se confirma por análisis de secuencia. Después de este procedimiento se identifican los segmentos de la cadena ligera que tienen secuencia 2B6 VL humanizada prevista. Plásmidos representativos, pMGx608 (que contienen una cadena pesada humanizada 2B6) y pMGx611 (que contienen una cadena ligera humanizada 2B6 con N₅₀ → Y y V₅₁ → A en la CDR2), con números de acceso a la ATCC PTA-5963 y PTA-5964, respectivamente, se depositaron bajo las provisiones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 Universidad Blvd., Manassas, Virginia. 20110-2209) el 7 de Mayo de 2004.

Los métodos generales para la construcción de los vectores descritos en la presente, transfección de células para producir la célula huésped descrita en la presente, cultivo de células para producir el anticuerpo de la invención son todos los métodos convencionales de biología molecular. De la misma manera, una vez producidos, los anticuerpos humanizados recombinantes de la invención se pueden purificar por procedimientos estándar de la técnica, que incluyen filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad por columna y electroforesis en gel.

Los anticuerpos específicos humanizados de FcγRIIB de la presente invención se pueden usar junto con, o unidos a, otros anticuerpos (o partes de estos), tales como anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Estos otros anticuerpos pueden ser reactivos con otros marcadores (epitopos) característicos de la enfermedad contra la que los anticuerpos de la invención se dirigen o pueden tener diferentes especificidades elegidas, *por ejemplo*, para reclutar moléculas o células del sistema inmunológico humano a las células enfermas. Los anticuerpos de la invención (o partes de estos) se pueden administrar con tales anticuerpos (o partes de estos) como composiciones administradas por separado o como una composición única con los dos agentes unidos por métodos biológicos moleculares o por química convencional. Además, el valor diagnóstico y terapéutico de los anticuerpos de la invención puede ser aumentado por el marcaje de los anticuerpos humanizados con marcadores que producen una señal detectable (*ya sea in vitro o in vivo*) o con un marcador que tiene una propiedad terapéutica. Algunos marcadores, *por ejemplo*, radionucleótidos, pueden producir una señal detectable y tener una propiedad terapéutica. Los ejemplos de marcadores radionúclidos incluyen, pero sin limitarse a, I¹²⁵, I¹³¹, y C¹⁴. Ejemplos de otros marcadores detectables incluyen un cromóforo fluorescente tal como fluoresceína, ficobiliproteína o rodamina de tetraetilo para microscopía de fluorescencia, una enzima que produce un producto coloreado o fluorescente para la detección por fluorescencia, absorbancia, color o aglutinación visible, que produce un producto denso de electrones para la demostración por microscopía electrónica; o una molécula densa de electrones tal como la ferritina, peroxidasa o perlas de oro para la visualización microscópica de electrones directa o indirecta. Los marcadores que tienen propiedades terapéuticas incluyen los fármacos para el tratamiento de cáncer, tal como el metotrexato y similares.

El objeto de la invención proporciona numerosos anticuerpos humanizados específicos para FcγRIIB basado en el descubrimiento de las regiones CDR del anticuerpo monoclonal murino que se podrían empalmar en el marco aceptor humano para producir un anticuerpo recombinante humanizado específico para FcγRIIB. Los anticuerpos específicos humanizados de FcγRIIB preferidos contienen un cambio adicional en la región marco (o en otras regiones) para aumentar la unión de FcγRIIB. Los anticuerpos particularmente preferidos son las moléculas de anticuerpos humanizados ejemplificados que tienen propiedades de unión superiores para FcγRIIB.

Se describen en la presente métodos estándar de ADN recombinante para la preparación de secuencias de ADN que codifican para los anticuerpos de la invención injertados con CDR. Las secuencias de ADN se pueden sintetizar completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Los métodos para la síntesis dirigida de oligonucleótido son bien conocidos en la técnica. Los métodos de mutagénesis dirigida al sitio tales como los conocidos en la técnica se describe en la presente.

Cualquier sistema adecuado de células huésped/vector se puede usar para la expresión de las secuencias de ADN que codifican para las cadenas pesadas y ligeras injertadas con CDR. Sistemas microbianos bacterianos, *por ejemplo*, *E. coli*, y otros se pueden usar, particularmente, para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab y (Fab')₂, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla, *por ejemplo*, FVs de

cadena sencilla. Los sistemas eucarióticos, *por ejemplo*, sistemas de expresión de células huésped de mamífero, se pueden usar para la producción de productos de anticuerpos más grandes injertados con CDR, que incluyen moléculas de anticuerpo completas. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO y mieloma o líneas celulares de hibridoma. Otras líneas celulares que se pueden usar incluyen, pero sin limitarse a, CHO-K1, NSO, y PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos).

Los anticuerpos murinos de los donantes de la invención se pueden producir usando cualquier método conocido en la técnica, que incluyen las descritas en las publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 2004/0185045; 2005/02157667; 2005/060213; y 2006/0013810; publicaciones internacionales núms. WO 04/016750; WO 2005/110474; WO 2005/115452; y WO 2006/066078.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papáina (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 al menos una porción de la región bisagra de la cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar usando además diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se presentan en la superficie de las partículas de fago los cuales portan las secuencias de polinucleótidos codificándolas. En una modalidad particular, tal fago se puede utilizar para mostrar los dominios de unión al antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado con enlaces disulfuro, expresado a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpo combinatoria (por ejemplo, humano o murino): Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés se pueden seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son fagos típicamente filamentosos, que incluyen fd y M13. Los dominios de unión al antígeno se expresan como una proteína fusionada de forma recombinante a ya sea la proteína del gen III o del gen VIII de fago. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que se pueden usar para hacer las inmunoglobulinas, o fragmentos de estas, de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman y otros, J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames y otros, J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough y otros, Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic y otros, Gene, 187:9-18, 1997; Burton y otros, Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; la solicitud del PCT núm. PCT/GB91/01134; las publicaciones del PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos núms. 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, las regiones que codifican el anticuerpo a partir del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otros fragmentos deseados, y expresar en cualquier huésped deseado, que incluyen células de mamífero, células de insecto, células de planta, levaduras y bacterias *por ejemplo*, como se describe en detalle más abajo. Por ejemplo, las técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden emplearse además usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y otros, BioTechniques, 12(6):864-869, 1992; y Sawai y otros, AJRI, 34:26-34, 1995; y Better y otros, Science, 240:1041-1043, 1988. Ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fvs y anticuerpos de una sola cadena incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 4,946,778 y 5,258,498; Huston y otros, Methods in Enzymology, 203:46-88, 1991; Shu y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90:7995-7999, 1993; y Skerra y otros, Science, 240:1038-1040, 1988.

La tecnología de presentación de fagos se puede usar para aumentar la afinidad de un anticuerpo de la invención para FcγRIIB. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad que se podrían usar con los métodos combinatorios de la invención. Esta tecnología, referida a la maduración de la afinidad, emplea la mutagénesis o desplazamiento de CDR y re-selección usando FcγRIIB o un fragmento antigénico de este para identificar anticuerpos con mayor afinidad al antígeno cuando se compara con el anticuerpo inicial o parental (*Ver por ejemplo*, Glaser y otros, 1992, J. Immunology 149:3903). Los codones mutagenizantes completos en lugar de los nucleótidos individuales resultan en un repertorio semi-aleatorio de mutaciones de aminoácidos. Las bibliotecas se pueden construir consistente de una mezcla de variantes de clones cada uno que difiere por una sola alteración de aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada residuo de CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada para el antígeno se pueden tamizar contactando los mutantes inmovilizados con el antígeno marcado. Cualquier método de selección conocido en la técnica se puede usar para identificar los anticuerpos mutantes con mayor afección al antígeno (*por ejemplo*, ELISA) (*Ver* Wu y otros, 1998, Proc Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95:6037; Yelton y otros, 1995, J. Immunology 155:1994). Es posible además el desplazamiento de CDR que aleatoriza la cadena ligera (*Ver* Schier y otros, 1996, J. Mol. Bio. 263:551).

6.2.1 Tamizaje de propiedades biológicas

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden caracterizar por la unión específica a FcγRIIB usando cualquier método conocido en la técnica con base inmunológica o bioquímica para caracterizar, que incluye cuantificar la interacción del anticuerpo a FcγRIIB. La unión específica de un anticuerpo humanizado de la invención a FcγRIIB se puede determinar, por ejemplo, usando métodos con base inmunológica o bioquímica, que incluyen, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón de superficie, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), y diálisis de equilibrio. Los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión inmuno-específica y la reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de difusión en gel de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, para nombrar sólo unos pocos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (*ver, por ejemplo*, Ausubel y otros, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden caracterizar por la unión a FcγRIIB usando un ensayo ELISA *in vitro*. Un ensayo ELISA ilustrativo para el uso en los métodos de la invención puede comprender lo siguiente: 2.5 ng/pocillo de la proteína de fusión soluble FcγRIIb-Fc que se prepara de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 60/439,709 y la solicitud de Estados Unidos núm. 10/756,153 (US 2004-0265321) se captura en placas Maxisorp de 96 pocillos por el anticuerpo de ratón 3H7 anti-FcγRIIb a temperatura ambiente durante 1 hora. Una dilución en serie de dos veces de medio condicionado de ch2B6 o hu2B6Hc/Ch2B6Lc a partir de 25ng/pocillo se añade a cada pocillo. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, después se detecta la unión por el anticuerpo secundario específico anti F(ab')₂ de IgG humana en carnero F(ab)₂ conjugado con HRP. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante aproximadamente 45 minutos, la placa se desarrolla usando un sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detiene por 1% de H₂SO₄. La DO 450 nm se lee por el programa SOFTmax. Entre cada etapa, las placas se lavan 3 veces con PBS/0.1% de Tween 20. Las placas se bloquean por 0.5% de BSA en PBS/0.1% de Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir FcγRIIb-Fc soluble.

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden caracterizar por la unión a células que expresan FcγRIIB, tales como las células Daudi y células Rajii usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Los clasificadores de flujo se capaces de rápidamente examinar un gran número de células individuales (*por ejemplo*, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro y otros, *Practical Flow Cytometry*, 1995). Los citómetros de flujo para clasificar y examinar las células biológicas son bien conocidos en la técnica. Citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 4,347,935; 5,464,581; 5,483,469; 5,602,039; 5,643,796; y 6,211,477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ fabricado por Becton Dickinson y Compañía, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica. Un análisis FACS ilustrativo para caracterizar los anticuerpos humanizados de la invención puede comprender lo siguiente: Aproximadamente 10⁶ células que expresan FcγRIIB, *por ejemplo*, células Daudi y células Rajii, se lavan al menos una vez con un tampón tal como PBS. Los anticuerpos primarios (*por ejemplo*, Ch2B6, Hu2B6Hc/ch2B6Lc, IgG1 humano) se diluyen, *por ejemplo*, en 0.5, 0.1, 0.02 µg/ml en PBS/1% de BSA y 100 µl de anticuerpos diluidos se transfieren a las células. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavan una vez con 1 ml de PBS/1% de BSA. El fragmento F(ab')₂ conjugado con PE de anti IgG humana específica a Fc en carnero (Jackson ImmunoResearch, Inc.) se usa como anticuerpo secundario a 1:1000 dilución. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavan una vez con 1 ml de PBS/1% de BSA. Después las células se resuspenden en 500 µl de PBS/1% de BSA y se someten a análisis FACS. Otras líneas celulares que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, células CHO-K1 (línea celular de hámster) transfectadas con CD32B; células CHO-K1 (línea celular de hámster) transfectadas con CD32A; células 293H (línea celular humana epitelial) transfectadas con CD32B; células 293H (línea celular humana epitelial) transfectadas con CD32A; células Raji (línea celular humana de linfoma de Burkitt); células Daudi (línea celular humana de linfoma de Burkitt) [las líneas celulares Raji y Daudi B expresan solamente CD32B endógena]; células THP-1 (línea celular humana monocítica) que expresan solamente CD32A endógeno; células U937 (línea celular humana monocítica) que expresan CD32A y CD32B endógeno; K526; HL60.

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden caracterizar además por mapeo de epítomos, de manera que los anticuerpos que se pueden seleccionar tienen la mayor especificidad para FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los métodos de mapeo de epítomos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se abarcan dentro de los métodos de la invención. En ciertas modalidades, FcγRIIB, o una proteína de fusión que comprende una o más regiones de FcγRIIB, se pueden usar en el mapeo del epítomo de un anticuerpo de la invención. En una modalidad específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionado a la porción Fc de IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender, además, sustituciones y/o sustituciones de aminoácidos de ciertas regiones del receptor con la región correspondiente de un receptor homólogo, *por ejemplo*, FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 2 más abajo. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el C-terminal

de FcγRIIB y el último con el C-terminal de FcγRIIA y se pueden usar para diferenciar la unión C-terminal. Los otros tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión a IgG y, cualquier N-terminal de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula del receptor donde se unen los anticuerpos.

5 **Tabla 2.** Lista de las proteínas de fusión que se pueden usar para investigar el epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB. Los residuos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión a IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de secuencia FcγRIIA están en negrita.

	Plásmido	Receptor	N-terminal	172-180	Sec. con núm. de ident.:	C-terminal	Sec. con núm. de ident.:
10	pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	51	APS-----SS (IIb)	57
	pMGX126	RIIa/b	IIa	QKFSRLDPN	52	APS-----SS (IIb)	57
15	pMGX127		IIa	QKFSRLDPT	53	APS-----SS (IIb)	57
	pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	54	APS-----SS (IIb)	57
	pMGX129		IIa	QKFSHLDPT	55	APS-----SS (IIb)	57
20	pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	56	APS-----SS (IIb)	57
	pMGX131		IIa	QKFSRLDPN	52	VPSMGSSS(IIa)	58
	pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	51	VPSMGSSS(IIa)	58
25	pMGX133	RIIa-131R	IIa	QKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)	58
	pMGX134	RIIa-131H	IIa	QKFSHLDPT	55	VPSMGSSS(IIa)	58
	pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)	58
30	pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	56	VPSMGSSS(IIa)	58

Las proteínas de fusión se pueden usar en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de la unión a un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención, *por ejemplo*, un ELISA. En otras modalidades, la confirmación adicional de la especificidad del epítipo se puede hacer usando péptidos con residuos específicos sustituidos con los de la secuencia FcγRIIA.

Los anticuerpos de la invención se pueden caracterizar por la unión específica a FcγRIIB usando cualquier método con base inmunológica o bioquímica conocido en la técnica para caracterizar incluyendo cuantificar, la interacción del anticuerpo a FcγRIIB. La unión específica de un anticuerpo humanizado de la invención a FcγRIIB se puede determinar, *por ejemplo*, usando métodos con base inmunológica o bioquímica, que incluyen, pero sin limitarse a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón de superficie, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y diálisis de equilibrio. Los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión inmuno-específica y la reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de difusión en gel de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, para nombrar sólo unos pocos. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (*ver, por ejemplo*, Ausubel y otros, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden ensayar además usando algunos ensayos basados en resonancia de plasmón de superficie conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción del anticuerpo con FcγRIIB. Cualquier instrumento SPR disponible en el comercio, que incluyen, pero sin limitarse a, Instrumentos BIAcore, disponible de Biacore AB (Uppsala, Suecia); Instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); sistema IBIS disponibles de Windsor Scientific Limited (Berks, Reino Unido); sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón); y Detector SPR Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, Texas) se pueden usar en la presente invención. Para una revisión de la tecnología basada en SPR, *ver* Mullet y otros, 2000, Methods 22: 77-91; Dong y otros, 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash y otros, 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich y otros, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Además, los métodos de la invención contemplan el uso de cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,373,577; 6,289,286; 5,322,798; 5,341,215; y 6,268,125.

En resumen, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro del par de unión sobre una superficie, y controlar en tiempo real su interacción con el otro miembro del par de unión en solución. SPR se basa en la medición

del cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se producen la inmovilización es el chip sensor, que está en el corazón de la tecnología SPR; el chip sensor consiste en una superficie de vidrio revestida con una capa delgada de oro y forma la base para una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de la molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores están disponibles en el comercio especialmente de compañías mencionadas *arriba*, los que se pueden usar en los métodos de la invención. Ejemplos de chips sensores incluyen aquellos disponibles de BIAcore AB, Inc., *por ejemplo*, Sensor Chip CM5, SA, NTA, y HPA. Una molécula de la invención se puede inmovilizar sobre la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos de inmovilización y composiciones químicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, unión de la biotina a la superficie revestida con avidina, acoplamiento aldehído a grupos carbohidratos, y unión a través de la etiqueta de histidina con chips de NTA.

La descripción abarca la caracterización de los anticuerpos humanizados producidos por los métodos descritos en la presente usando ciertos ensayos de caracterización para la identificación de la función de los anticuerpos de la invención, particularmente para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización de la invención pueden medir la fosforilación de los residuos de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de células B. Los ensayos de caracterización de la invención pueden ser ensayos basados en células o libre de células.

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

La descripción abarca caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención en la modulación de una o más respuestas mediadas por IgE. Preferentemente, se usarán líneas de células co-expresando el receptor de alta afinidad de IgE y el receptor de baja afinidad de FcγRIIB en la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención en la modulación de las respuestas mediadas por IgE. En una modalidad específica, se usarán las células de la línea de células de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. y otros 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317), transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa en los métodos de la invención. RBL-2H3 es una línea de células de rata bien caracterizada que se ha usado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización seguida la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en las células RBL-2H3 y coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio inducida por FcεRI, desgranulación, y producción de citocina (Malbec y otros, 1998, *J. Immunol.* 160:1647; Daeron y otros, 1995 *J. Clin. Invest.* 95:577; Ott y otros, 2002 *J. of Immunol.* 168:4430-4439).

La descripción abarca caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención para la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, células de la línea de células de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. y otros 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317) que se transfectaron con FcγRIIB se sensibilizan con IgE y estimulan ya sea con fragmentos F(ab')₂ de anti-IgG de ratón en conejo, para agregarse solamente a FcεRI, o con anti-IgG completa de ratón en conejo para coagregarse a FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas de señalización corriente abajo puede ensayarse después de la adición de los anticuerpos de la invención a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, se pueden ensayar la fosforilación de la tirosina de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, la activación de los miembros de la familia quinasa MAP, que incluyen, pero sin limitarse a Erk1, Erk2, JNK, o p38; y la fosforilación de la tirosina de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP

Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI mediante los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: transfectar las células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular las células RBL-H23 ya sea con F(ab')₂ de anti-IgG de ratón en conejo (para agregar FcεRI solamente e inducir la señalización mediada por FcεRI, como un control), o estimular las células RBL-H23 con anti-IgG completa de ratón en conejo (para coagregar FcγRIIB y FcεRI, resultando en la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que se estimularon con anticuerpos completos anti-IgG de ratón en conejo se pueden pre-incubar además con los anticuerpos de la invención. Medir la actividad dependiente de FcεRI de las células que se pre-incubaron con los anticuerpos de la invención y células que no se pre-incubaron con los anticuerpos de la invención, y comparar los niveles de actividad de dependiente de FcεRI en estas células, pueden indicar una modulación dependiente de FcεRI de la actividad de los anticuerpos de la invención.

El ensayo ilustrativo descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para identificar los anticuerpos que bloquean la unión de ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Del mismo modo, este ensayo identifica anticuerpos que mejoran

la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI promoviendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

5 En una modalidad preferida, la actividad dependiente de FcεRI es al menos una o más de las siguientes: la modulación de moléculas de señalización corriente abajo (por ejemplo, la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación del reclutamiento de SHIP, modulación de la actividad MAP quinasa, modulación del estado de fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación del estado de fosforilación de p62^{dok}, modulación de p62^{dok} y asociación de SHIP, modulación de p62^{dok} y asociación de RasGAP, modulación de la movilización de calcio, modulación de la desgranulación, y modulación de la producción de citocina. En aun otra modalidad preferida, 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 conocido por el experto en la técnica que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación de la tirosina de FcγRIIB, estimula el reclutamiento de SHIP, estimula la fosforilación de la tirosina de SHIP y asociación con Shc e inhibe la activación de los miembros de la familia de las MAP quinastas, que incluyen, pero sin limitarse a, Erk1, Erk2, JNK, p38. Se conoce además por aquellos con experiencia en la técnica que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación mejorada de la tirosina de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.

20 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE controlando 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 se han manipulado genéticamente para que contengan FcγRIIB humano usando los métodos recombinantes estándar conocidos por el experto en la técnica. En una modalidad específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo basado en células de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos). La liberación de β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un evento primario en la afección inflamatoria y alérgica aguda (Aketani y otros, 2001 Immunol. Lett. 75: 185-9; Aketani y otros, 2000 Anal. Chem. 72: 2653-8. La liberación de otros mediadores inflamatorios, que incluyen, pero sin limitarse a, serotonina e histamina, pueden ensayarse para medir una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los métodos de la invención. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, la liberación de gránulos tales como aquellos que contienen β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia mediante el entrecruzamiento de FcεRI con el antígeno multivalente.

35 Un ensayo ilustrativo para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención en la mediación de una respuesta mediada por IgE es un ensayo de liberación de β--hexosaminidasa que comprende lo siguiente: transfectar las células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células con IgE de ratón solo o IgE de ratón y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención; estimular las células con diversas concentraciones de anti-F(ab)₂ de ratón en carnero, 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, *por ejemplo*, usando p-nitrofenil N-acetil-β -D-glucosaminida. La actividad β-hexosaminidasa liberada se expresa como un porcentaje de la actividad liberada con relación a la actividad total. La actividad β-hexosaminidasa liberada se medirá y se comparará en las células tratadas con antígeno solo; IgE solo; IgE y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención. Aun sin pretender estar limitados por un mecanismo de acción en particular, una vez que las células se sensibilizan con IgE de ratón solo y desafían a fragmentos F(ab)₂ de un policlonal anti-IgG de ratón en carnero, 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 los mastocitos F(ab)₂ de un policlonal anti-IgG de ratón en carnero, se produce el entrecruzamiento de FcγRIIB y FcεRI, dando como resultado la inhibición de la desgranulación inducida por FcεRI. En cualquier caso, el anti-F(ab)₂ de ratón en carnero induce una liberación de β-hexosaminidasa dependiente de la dosis. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-FcγRIIB unidos al receptor FcγRIIB y entrecruzados con FcεRI no afectan a la activación de la ruta inhibitoria, *es decir*, no existe ninguna alteración en el nivel de la desgranulación en presencia de un anticuerpo anti-FcγRIIB. En otras modalidades, los anticuerpos anti-FcγRIIB median una activación más fuerte del receptor inhibitorio, FcγRII, cuando está unido con el anticuerpo anti-FcγRIIB, permitiendo el entrecruzamiento eficaz con FcεRI y la activación de ruta inhibitoria de FcγRIIB homoagregado.

55 La descripción abarca además caracterizar el efecto de los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención en la respuesta celular mediada por IgE usando ensayos de movilización de calcio usando metodologías conocidas por el experto en la técnica. Un ensayo ilustrativo de movilización de calcio puede comprender lo siguiente: cebar basófilos o mastocitos con IgE; incubar las células con un indicador de calcio, *por ejemplo*, Fura 2; estimular las células como se describió *arriba*; y controlar y/o cuantificar la concentración de calcio intracelular, *por ejemplo*, usando citometría de flujo. La invención abarca controlar y/o cuantificar la concentración de calcio intracelular mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. *Ver, por ejemplo*, Immunology Letters, 2001, 75:185-9; British J. of Pharm, 2002, 136:837-45; J. of Immunology, 168:4430-9 y J. of Cell Biol., 153(2):339-49.

65 En modalidades preferidas, los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención inhiben la activación celular mediada por IgE. En otras modalidades, los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención bloquean las rutas

inhibidoras reguladas por FcγRIIB o bloquean el sitio de unión del ligando en FcγRIIB y, potencian así, la respuesta inmune.

5 La capacidad de estudiar mastocitos humanos se ha limitado por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos a largo plazo adecuados. Recientemente, se establecieron dos nuevas líneas de células de mastocitos humanos dependientes de factor de células madre, denominadas LAD 1 y LAD 2, a partir de aspirados de la médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum y otros, 2003, *Leukemia research*, 27:677-82). Se describió que ambas líneas de células expresan FcεRI y diversos marcadores de mastocitos humanos. La invención abarca el uso de células de LAD 1 y 2 en los métodos de la invención para evaluar el efecto de los anticuerpos humanizados de la invención en las respuestas mediadas por IgE. En una modalidad específica, pueden usarse ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células tales como los descritos *arriba* en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención. En un ensayo ilustrativo, los mastocitos humanos, *por ejemplo*, LAD 1, se ceban con anti-IgE humana quimérica-nitrofenol (NP) y desafían con BSA-NP, el antígeno polivalente, y se controla la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum y otros, 2003, *Leukemia research*, 27:677-682).

20 En algunas modalidades, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, como determinado usando métodos estándar conocidos en la técnica, *por ejemplo*, tinción de FACS, puede ser difícil controlar y/o detectar diferencias en la activación de la ruta inhibidora mediada por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. Así, la invención abarca métodos alternativos, mediante los cuales puede sobre-regularse la expresión de FcγRIIB usando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que FcγRIIB está muy sobre regulado en líneas de células de monocitos, *por ejemplo*, THP1 y U937, (Tridandapani y otros, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089) y en monocitos primarios humanos (Pricop y otros, 2001, *J. of Immunol.*, 166: 531-537) por IL4. Se ha descrito que la diferenciación de las células U937 con AMP cíclico dibutirilo incrementa la expresión de FcγRIIB (Cameron y otros, 2002 *Immunology Letters* 83, 171-179). Así, la expresión de FcγRIIB endógeno en mastocitos humanos para su uso en los métodos de la invención puede sobreregularse usando citocinas, *por ejemplo*, IL-4, IL-13, para mejorar la sensibilidad de detección.

30 La invención también abarca caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención para la inhibición de la señalización mediada por el receptor de células 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 células 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.

35 Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende al menos uno o más de lo siguiente: la modulación de las moléculas de señalización corriente abajo (*por ejemplo*, estado de fosforilación de FcγRIIB, reclutamiento de SHIP, localización de Btk y/o PLCγ, actividad MAP quinasa, reclutamiento de Akt (señal anti-apoptótica), movilización de calcio, progresión del ciclo celular, y proliferación celular).

40 Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB están mediadas a través de SHIP, se ha demostrado recientemente que las células B activadas por el lipopolisacárido (LPS) a partir de ratones deficientes de SHIP muestran una significativa inhibición mediada por FcγRIIB de la movilización de calcio, la producción de Ins (1,4,5)P₃, y la fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler A. y otros, 2001, *Journal of Immunology*, 167(1): 204-211). Como consecuencia, *ex vivo* las células B de ratones deficientes de SHIP pueden usarse para caracterizar los anticuerpos de la invención. Un ensayo ilustrativo para determinar mediante los anticuerpos de la invención la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR puede comprender lo siguiente: aislar células B esplénicas a partir de ratones deficientes de SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido y estimular dichas células ya sea con anti-F(ab')₂ IgM para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que se estimularon con anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB se pueden pre-incubar además con los anticuerpos de la invención. La actividad de las células dependiente de FcγRIIB puede medirse mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica y usarse para, *por ejemplo*, comparar el nivel de actividad dependiente de FcγRIIB en células que se preincubaron y células que no se preincubaron con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles puede indicar una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos de la invención.

55 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, o medir la proliferación de células B mediada por FcγRIIB.

60 Los ensayos se pueden usar, por ejemplo, para identificar los anticuerpos que modulan la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB mediante el bloqueo del sitio de unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y la antagonización de la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB impidiendo la coagregación de FcγRIIB y BCR. Los ensayos se pueden usar además para identificar los anticuerpos que mejoran la coagregación de FcγRIIB y BCR y agonizan la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB.

La descripción se refiere a la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención para la señalización mediada por FcγRII en los monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor que contiene el motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) actúa para regular negativamente la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como su efector (Tridandapani y otros 2002, J. Biol. Chem. 277(7):5082-9. La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB resulta en la rápida fosforilación del residuo de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, conduciendo a una mejoría en la fosforilación de SHIP, asociación de SHIP con Shc y fosforilación de proteínas que tienen peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB resulta en la regulación negativa de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina quinasa que está involucrada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

La descripción abarca además la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la invención por su inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en los monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, pueden estimularse las células de una línea celular monocítica humana, THP-, ya sea con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcγRIIA

(Medarex, Inc.) y el anticuerpo anti-ratón en carnero (para agregar FcγRIIA solo) , o con el anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y el anticuerpo anti-ratón en carnero (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB) . En este sistema, puede ensayarse la modulación de moléculas de señalización corriente abajo, tales como la fosforilación de tirosina de FcγRIIB, fosforilación de SHIP, asociación de SHIP con Shc, fosforilación de Akt, y fosforilación de proteínas con peso molecular de 120 y 60-65 kDa se puede ensayar después de la adición de anticuerpos de la invención a las células estimuladas. Adicionalmente, la eficacia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la línea celular de monocitos puede medirse directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención.

Otro ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: estimular las células THP-1 ya sea con Fab del anticuerpo anti-FcγRII en ratón IV. 3 y anticuerpo anti-ratón en carnero (para agregar FcγRIIA solo e inducir una señalización mediada por FcγRIIA); o con anticuerpo anti-FcγRII en ratón y anticuerpo anti-ratón en carnero (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA). Las células que se estimularon con el anticuerpo anti-FcγRII en ratón y el anticuerpo anti-ratón en carnero se pueden pre-incubar además con los anticuerpos de la invención. Medir la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que se han preincubado con los anticuerpos de la invención y de células que no se han preincubado con dichos anticuerpos y comparar los niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células puede indicar una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos.

El ensayo ilustrativo descrito se puede usar, por ejemplo, para identificar los anticuerpos que bloquean la unión al ligando del receptor FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Del mismo modo, este ensayo identifica anticuerpos que mejoran la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

La descripción se refiere además a la caracterización de la función de los anticuerpos humanizados de la invención midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceínada mediante los métodos descritos anteriormente (Tridandapani y otros, 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ilustrativo para medir la fagocitosis consiste en: tratar las células THP-1 con los anticuerpos de la invención o con un anticuerpo de control que no se une a FcγRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en donde una diferencia en las actividades de las células (*por ejemplo*, la actividad de formación de rosetas, (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubierta con IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1) y la velocidad fagocítica) puede indicar una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención. Este ensayo puede usarse para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloquean la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo puede identificar también anticuerpos que mejoran la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

En una modalidad preferida, los anticuerpos humanizados de la invención modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en al menos una o más de las siguientes formas: modulación de moléculas de señalización corriente abajo (*por ejemplo*, la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de aproximadamente 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

La descripción abarca la caracterización de los anticuerpos humanizados de la invención usando ensayos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica para identificar el efecto de los anticuerpos sobre la función de células efectoras de los anticuerpos terapéuticos, *por ejemplo*, su capacidad para mejorar la actividad ADCC tumor-específico de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos antitumorales, anticuerpos antivíricos, anticuerpos antimicrobianos (*por ejemplo*, parásitos bacterianos y unicelulares), cuyos ejemplos se describen en la presente descripción (sección 5.3.6). En particular, la descripción abarca caracterizar los anticuerpos de la invención por su efecto sobre la función de células

efectoras mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos, *por ejemplo*, anticuerpos monoclonales tumor-específico. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ensayarse de acuerdo con la descripción, incluyen, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Cualquier ensayo basado en células o sin células conocido por aquellos con experiencia en la técnica puede usarse para determinar la actividad funcional de células efectoras (para ensayos de células efectoras, *ver* Perussia y otros, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini y otros, 1998 *Experientia*, 44(10): 841-8; Lehmann y otros, 2000 *J. Immunol. Methods*, 243(1-2): 229-42; Brown E.J. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-64; Munn y otros, 1990 *J. Exp. Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid y otros, 2002 *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding y otros, 1998, *Immunity* 8:403-411).

Los anticuerpos de la invención se pueden ensayar por su efecto sobre la actividad ADCC mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos en células efectoras, *por ejemplo*, células citolíticas naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (*ver por ejemplo*, Perussia y otros, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92). "Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos" y "ADCC" como se usan en el presente documento poseen su significado ordinario 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 FcγRs (*por ejemplo*, células monocíticas tales como células citolíticas naturales (NK) y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula objetivo. En principio, cualquier célula efectora con un FcγR activador puede dirigirse para mediar ADCC. Las células primarias para mediar ADCC son las células 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, *ver, por ejemplo*, Ravetch y otros, 1991, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92.

Las células efectoras son leucocitos que expresan uno o más FcγRs y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Las células efectoras que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, y neutrófilos; siendo preferidas las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una de sus fuentes nativas, *por ejemplo*, a partir de sangre o PMBCs como se describe en la presente descripción. Preferentemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que, preferentemente, se purifican a partir de sangre humana normal, usando métodos estándar conocidos por el experto en la técnica, *por ejemplo*, usando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Por ejemplo, las PMBC pueden aislarse separando en capas la sangre completa sobre Ficoll-Hypaque y centrifugando las células a 500 g, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa de leucocito puede recogerse como células efectoras. Otras células efectoras que pueden usarse en los ensayos de ADCC de la invención incluyen, pero sin limitarse a, macrófagos derivados de monocitos (MDMs). Los MDM que se usan como células efectoras en los métodos de la invención se obtienen, preferentemente, como reserva congeladas o se usan recién preparadas (*por ejemplo*, de Advanced Biotechnologies, MD). En las modalidades más preferidas, se usan como células efectoras los monocitos humanos elutriados en los métodos de la invención. Los monocitos humanos elutriados expresan receptores de activación, FcγRIIIA y FcγRIIA y el receptor inhibitorio, FcγRIIB. Los monocitos humanos están disponibles en el comercio 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 que contiene citocinas. Los niveles de expresión de FcγRs en las células pueden determinarse directamente; *por ejemplo* usando análisis por FACS. Alternativamente, puede dejarse además que las células maduren a macrófagos en cultivo. El nivel de expresión de FcγRIIB se puede aumentar en los macrófagos. Los anticuerpos que pueden usarse para determinar el nivel de expresión de FcγRs incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos anti-FcγRIIA humano, *por ejemplo*, IV.3-FTTC; anticuerpos anti-FcγRI, *por ejemplo*, 32.2 FITC; y anticuerpos anti-FcγRIIIA, *por ejemplo*, 3G8-PE.

Las células objetivo usadas en los ensayos ADCC incluyen, pero sin limitarse a, líneas de células de cáncer de mama, *por ejemplo*, SK-BR-3 con número de acceso a ATCC HTB-30 (*ver, por ejemplo*, Tremp y otros, 1976, *Cancer Res.* 33: 41); células B; células derivadas de linfoma de Burkitts, *por ejemplo*, células de Raji con número de acceso a ATCC CCL-86 (*ver, por ejemplo*, Epstein y otros, 1965, *J. Natl. Cancers Inst.* 34: 231-240), células Daudi con número de acceso a ATCC CCL-213 (*ver, por ejemplo*, Klein y otros, 1968, *Cancer Res.* 28: 1300-10); líneas de células de carcinoma ovárico, *por ejemplo*, OVCAR-3 con número de acceso a ATCC HTB-161 (*ver, por ejemplo*, Hamilton, Young y otros, 1983), SK-OV-3, PA-1, CAOV3, OV-90, y IGROV-1 (disponible del depósito del NCI; Benard y otros, 1985, *Cancer Research*, 45:4970-9. Las células objetivo deben reconocerse por el sitio de unión al antígeno del anticuerpo que se ensaya. Las células objetivo para su uso en los métodos de la invención pueden tener un nivel de expresión bajo, medio o alto de un antígeno de cáncer. Los niveles de expresión del antígeno de cáncer pueden determinarse usando métodos comunes conocidos por el experto en la técnica, *por ejemplo*, análisis de FACS. Por ejemplo, la descripción abarca el uso de células de cáncer de ovario, tal como IGROV-1 en donde Her2/neu se expresa a diferentes niveles, u OVCAR-3 (número de acceso a ATCC HTB-161; caracterizada por una expresión de Her2/neu inferior a SK-BR-3, la línea celular de carcinoma de mama). Otras líneas de células de carcinoma de ovario que pueden usarse como células objetivo en los métodos de la invención incluyen OVCAR-8 (Hamilton y otros, 1983, *Cancer Res.* 43:5379-89); SK-OV-3 (número de acceso a ATCC HTB-77); Caov-3 (número de acceso a ATCC HTB-75); PA-1 (número de acceso a ATCC CRL-1572); OV-90 (número de acceso a ATCC CRL-11732); y OVCAR-4. Otras líneas de células de cáncer de mama que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen BT-549 (número de acceso a ATCC HTB-122),

5 MCF7 (número de acceso a ATCC HTB-22), y Hs578T (número de acceso a ATCC HTB-126), todos los cuales están disponibles desde el repositorio NCI y ATCC. Otras líneas de células que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, CCRF-CEM (leucemia); HL-60 (TB, leucemia); MOLT-4 (leucemia); RPMI-8226 (leucemia); SR (leucemia); A549 (de pulmón de células no pequeñas); EKVX (de pulmón de células no pequeñas); HOP-62 (de pulmón de células no pequeñas); HOP-92 (de pulmón de células no pequeñas); NC1-H226 (de pulmón de células no pequeñas); NCI-H23 (de pulmón de células no pequeñas); NCI-H322M (de pulmón de células no pequeñas); NCI-H460 (de pulmón de células no pequeñas); NCI-H522 (de pulmón de células no pequeñas); COLO 205 (Colon); HCC-2998 (Colon); HCT-116 (Colon); HCT-15 (Colon); HT29 (Colon); KM12 (Colon); SW-620 (Colon); SF-268 (CNS); SF-295 (CNS); SF-539 (CNS); SNB-19 (CNS); SNB-75 (CNS); U251 (CNS); LOX 1MV1 (Melanoma); MALME-3M (Melanoma); M14 (Melanoma); SK-MEL-2 (Melanoma); SK-MEL-28 (Melanoma); SK-MEL-5 (Melanoma); UACC-257 (Melanoma); UACC-62 (Melanoma); IGR-OV1 (ovario); OVCAR-3, 4, 5, 8 (ovario); SK-OV-3 (ovario); 786-0 (Renal); A498 (Renal); ACHN (Renal); CAKI-1 (Renal); SN12C(Renal); TK-10 (Renal); UO-31 (Renal); PC-3C (próstata); DU-145 (próstata); NCI/ADR-RES (mama); MDA-MB-231/ATCC (mama); MDA-MB-435 (mama); DMS 114 (de pulmón de células pequeñas); y SHP-77 (de pulmón de células pequeñas); todos los cuales están disponibles en el NCI.

15 Un ensayo ilustrativo para determinar el efecto de los anticuerpos de la invención en la actividad ADCC de los anticuerpos terapéuticos se basa en un ensayo de liberación de ^{51}Cr que comprende: marcar las células objetivo con $^{51}\text{Cr}[\text{Na}_2\text{CrO}_4$ (esta molécula permeable a la membrana celular se usa comúnmente para marcar ya que se une a proteínas citoplasmáticas y, aunque se libera de forma espontánea de las células con cinética lenta, se libera de forma masiva tras la lisis de la célula objetivo); preferentemente, las células objetivo expresan uno o más antígenos tumorales, opsonizando las células objetivo con uno o más anticuerpos que unen inmunoespecíficamente los antígenos tumorales expresados en la superficie celular de las células objetivo, en presencia y ausencia de un anticuerpo de la invención, *por ejemplo*, 2B6, 3H7, combinar las células objetivo radiomarcadas opsonizadas con las células efectoras en una placa de microtitulación a una relación adecuada de células objetivo para células efectoras; 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: Porcentaje de lisis específica = (lisis experimental-lisis independiente de anticuerpo/lisis máxima-lisis independiente de anticuerpo) x 100%. Se puede generar un gráfico ya sea variando la relación de células objetivo: efectoras o la concentración del anticuerpo.

20 Los anticuerpos de la invención se pueden caracterizar por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de acuerdo con el método descrito anteriormente; *ver, por ejemplo*, Ding y otros, Immunity, 1998, 8:403-11.

25 En algunas modalidades, la descripción abarca caracterizar la función de los anticuerpos de la invención para mejorar la actividad ADCC de anticuerpos terapéuticos en un ensayo basado *in vitro* y/o en un modelo animal.

30 En una modalidad específica, la invención abarca determinar la función de los anticuerpos humanizados de la invención en la mejoría de la ADCC específica tumoral usando un modelo de cáncer de ovario y/o un modelo de cáncer de mama.

35 Preferentemente, los ensayos de ADCC se realizan usando más de una línea celular de cáncer, caracterizadas por la expresión de al menos un antígeno de cáncer, en donde el nivel de expresión del antígeno de cáncer varía entre las líneas de células de cáncer usadas. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, realizar ensayos de ADCC en más de una línea celular en donde el nivel de expresión del antígeno de cáncer varía, permitirá la determinación de la rigurosidad en el aclaramiento del tumor de los anticuerpos de la invención. En una modalidad, los ensayos de ADCC de la invención se realizan usando líneas de células de cáncer con diferentes niveles de expresión de un antígeno de cáncer.

40 En un ensayo ilustrativo, OVCAR3, una línea celular de carcinoma de ovario, puede servir como objetivo 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 Fc γ RIIA y Fc γ RIIB inhibidor; y pueden usarse como anticuerpos tumorales específicos los anticuerpos murinos tumorales específicos, ch4D5 y chCC49. Las células OVCAR-3 están disponibles de ATCC (número de acceso HTB-161). Preferentemente, las células OVCAR-3 se propagan en medio suplementado con 0.01 mg/ml de insulina bovina. 5×10^6 células de OVCAR-3 viables se pueden inyectar por vía subcutánea (s.c.) en ratones atímicos desnudos de edad y peso concordantes con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede calcularse mediante la fórmula: longitud-(ancho) $^2/2$, y, preferentemente, no excede de 3 gramos. Un tumor dependiente de anclaje puede aislarse tras 6-8 semanas y las células pueden disociarse añadiendo 1 μg de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor y 5 mg/ml de ribonucleasa, pasándolas a través de una malla de nailon y filtro celular para aislar las células. Las células se pueden congelar después por almacenamiento a largo plazo para la inyección s.c. durante el establecimiento del modelo de xenoinjerto.

45 Los hibridomas que segregan los anticuerpos CC49 y 4D5 están disponibles con número de acceso a ATCC HB-9459 y CRL-3D463 y las secuencias de nucleótidos de cadena pesada y de cadena ligera son de dominio público (*ver, por ejemplo*, Murray y otros, 1994 Cancer 73 (35):1057-66, Yamamoto y otros, 1986 Nature, 319:230-4). Preferentemente, los anticuerpos 4D5 y CC49 se quimerizan usando métodos estándar conocidos por el experto en la técnica tal que la secuencia Fc humana, *por ejemplo*, la región constante de IgG1 humana, se injerta en la región variable de los

anticuerpos murinos para proporcionar la función efectora. Los anticuerpos quiméricos 4D5 y CC49 se unen a través de su región variable a las líneas de células objetivo y a través de su región Fc a FcγRs expresadas en las células efectoras humanas. CC49 está dirigido a TAG-72, una mucina de alto peso molecular que está altamente expresada en varias células de adenocarcinoma y carcinoma de ovario (Lottich y otros, 1985 *mama Cancer Res. Treat.* 6(1):49-56; Mansi y otros, 1989 *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* 16(2):127-35; Colcher y otros, 1991 *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.* 18:395-41). 4D5 está dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (Carter y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-9). Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar después para investigar la mejoría de la actividad ADCC de los anticuerpos específicos al tumor, bloqueando el FcγRIIB inhibidor. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, después de la activación de células efectoras que expresan al menos un FcγR activador *por ejemplo*, FcγRIIA, la expresión del receptor inhibidor (FcγRIIB) se mejora y esto limita la depuración tumoral, ya que se suprime la actividad ADCC de FcγRIIA. Sin embargo, los anticuerpos de la invención pueden servir como anticuerpo de bloqueo, es *decir*, un anticuerpo que evitará que la señal inhibidora se active y, así, la señal de activación, *por ejemplo*, la actividad ADCC, se mantendrá durante un periodo de tiempo mayor y puede resultar en una depuración potente del tumor.

Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la invención para usar en la mejoría de la actividad de ADCC se modificaron para comprender al menos una modificación de aminoácido, tal que la unión de su región Fc a FcγR se redujo, con máxima preferencia se anuló. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se modificaron para que comprendan al menos una modificación de aminoácido que reduce la unión del dominio constante a un FcγR activador, *por ejemplo*, FcγRIIA, FcγRIIB, en comparación con un anticuerpo de tipo silvestre de la invención mientras que mantienen la actividad máxima de bloqueo de FcγRIIB. Los anticuerpos de la invención pueden modificarse de acuerdo con cualquier método conocido por el experto en la técnica o descrito en la presente descripción. Cualquier modificación de aminoácidos que se sabe que perturban la función efectora puede ser usada de acuerdo con los métodos de la invención, tales como los descritos en las publicaciones internacionales núms. WO 04/063351, WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089; publicación de las solicitudes de patente de los Estados Unidos Núms. 2005/0037000; y 2005/0064514 y las patentes de Estados Unidos núms. 5,843,597 y 5,642,821. La invención abarca además cualquiera de las mutaciones descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 10/902,588 (presentada el 28 de julio de 2004) y 11/271,140 (presentada el 10 de noviembre de 2005), y las publicaciones internacionales núms. WO 2007/106707 y WO 2007/021841. En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención se modifican de forma que se modifica la posición 265, *por ejemplo*, la posición 265 está sustituida con alanina. En modalidades 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 otros, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276:6591-6604). En otras modalidades, los anticuerpos de la invención se modifican tal que se modifica la posición 297, *por ejemplo*, la posición 297 se sustituye con glutamina, tal que se elimina el sitio de glucosilación enlazado a N (*ver, por ejemplo*, Jefferies y otros, 1995, *Immunol. Lett.* 44:111-7; Lund y otros, 1996, *J. Immunol.*, 157:4963-69; Wright y otros, 1994, *J. Exp. Med.* 180:1087-96; White y otros, 1997, *J. Immunol.* 158:426-35. Se reportó que la modificación en este sitio suprime toda interacción con los FcγR. En modalidades 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 en la posición 265 y/o 297, tal que se suprime la función efectora, mientras que se mantiene la actividad de bloqueo de FcγRIIB.

Un ensayo ilustrativo para determinar la actividad de ADCC de los anticuerpos tumorales específicos en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención es un ensayo de fluorescencia basado en europio no radioactivo (BATDA, Perkin Elmer) y puede comprender lo siguiente: marcar las células objetivos con un éster de acetoximetilo del éster que mejora la fluorescencia que forma un ligando hidrófilo (TDA) con la membrana de células mediante la hidrólisis de los ésteres (este complejo es incapaz de dejar la célula y se libera sólo tras la lisis de la célula por los efectores); añadir los objetivos marcados a las células efectoras en presencia de anticuerpos anti-tumorales y un anticuerpo de la invención; e incubar la mezcla de las células objetivo y efectora 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 independiente del anticuerpo/lisis máxima- lisis independiente del anticuerpo x 100%).

En algunas modalidades, si la sensibilidad del ensayo de ADCC basado en fluorescencia es demasiado baja para detectar la actividad ADCC de los anticuerpos terapéuticos, la invención abarca el uso de ensayos de ADCC basados en radioactividad, tal como el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Los ensayos basados en radioactividad pueden realizarse en lugar de o en conjunto con los ensayos de ADCC basados en fluorescencia.

Un ensayo ilustrativo de liberación de ⁵¹Cr para caracterizar los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: marcar 1-2 x10⁶ células objetivo tales como células OVCAR-3 con ⁵¹Cr; opsonizar las células objetivo con

5 anticuerpos 4D5 y CC49 en presencia y ausencia de un anticuerpo de la invención y añadir 5×10^3 células a la placa de 96 pocillos (preferentemente 4D5 y CC49 están a una concentración que varía de 1-15 $\mu\text{g/ml}$); añadir las células objetivo opsonizadas a los macrófagos derivados de monocitos (MDM) (células efectoras); preferentemente en una relación que varía de 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 de la invención puede determinarse después, por ejemplo, usando la fórmula siguiente de porcentaje de lisis específica = $(\text{lisis experimental} - \text{lisis independiente de anticuerpo} / \text{lisis máxima} - \text{lisis independiente de anticuerpo}) \times 100\%$.

10 En algunos ejemplos, la actividad *in vivo* de los anticuerpos Fc γ RIIB humanizados de la invención se determina en los modelos de xenoinjerto tumoral humano. Los tumores se pueden establecer usando cualquiera de las líneas de células de cáncer descritas *arriba*. En algunas modalidades, los tumores se establecerán con dos líneas de células de cáncer, en donde la primera línea de células de cáncer se caracteriza por una baja expresión de un antígeno de cáncer y una segunda línea de células de cáncer, en donde la segunda línea de células de cáncer se caracteriza por una alta expresión del mismo antígeno de cáncer. La depuración del tumor puede determinarse después usando los métodos conocidos por el experto en la técnica, con un anticuerpo antitumoral que une inmunoespecíficamente el antígeno de cáncer de la primera y la segunda línea de células de cáncer y un modelo de ratón adecuado, *por ejemplo*, modelo de ratón desnudo Balb/c (*por ejemplo*, Jackson Laboratories, Taconic), con monocitos humanos transferidos adoptivamente y las MDMs como células efectoras. Cualquiera de los anticuerpos descritos *arriba* puede probarse después, en este modelo animal para evaluar el papel del anticuerpo anti-Fc γ RIIB de la invención en la depuración del tumor. Los ratones que pueden usarse en la invención incluyen por ejemplo Fc γ RIII -/- (donde Fc γ RIIIA está knock-out); ratón desnudo Fc γ -/- (donde Fc γ RI y Fc γ RIIIA están knock-out); o ratones Fc γ RIIB humano knock-in o unos ratones transgénicos knock-in, donde los loci de ratón *fcgr2* y *fcgr3* en el cromosoma 1 se inactivan y los ratones expresan Fc γ RIIA humano, Fc γ RIIA humano, Fc γ RIIB humano, Fc γ RIIC humano, Fc γ RIIIA humano, y Fc γ RIIIB humano.

25 Un método ilustrativo para probar la actividad *in vivo* de un anticuerpo de la invención puede comprender lo siguiente: establecer un modelo murino de xenoinjerto usando una línea de células de cáncer caracterizada por la expresión de un antígeno de cáncer y determinar el efecto de un anticuerpo de la invención sobre un anticuerpo específico para el antígeno de cáncer expresado en la línea de células de cáncer al mediar la depuración del tumor. Preferentemente, la actividad *in vivo* se prueba en paralelo usando dos líneas de células de cáncer, en donde la primera línea de células de cáncer se caracteriza por un primer antígeno de cáncer expresado a bajos niveles y una segunda línea de células de cáncer, caracterizada por el mismo antígeno de cáncer expresado a un nivel más alto en relación con la primera línea de células de cáncer. Estos experimentos incrementarán, así, la rigurosidad de la evaluación del papel de un de la invención en la depuración del tumor. Por ejemplo, pueden establecerse los tumores con la línea celular IGROV-1 y puede evaluarse el efecto de un anticuerpo anti-Fc γ RIIB de la invención en la depuración del tumor de un anticuerpo específico a Her2/neu. Para establecer los modelos tumorales de xenoinjerto, 5×10^6 células viables, *por ejemplo*, IGROV-1, SKBR3, pueden inyectarse, *por ejemplo*, s.c. en ratones, *por ejemplo*, 8 ratones hembras desnudos atímicos de edad y peso concordantes usando por ejemplo, Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede determinarse mediante la fórmula: longitud \times (ancho)²/2 y, preferentemente, no excede de 3 gramos. La inyección s.c. de células IGROV-1 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 otros, 1985, Cancer Res. 45:4970-9; incorporada como referencia en su totalidad). Dado que las células IGROV-1 forman tumores en 5 semanas, en el día 1 después de la inyección de células tumorales, se co-inyectan i.p. los monocitos como células efectoras junto con un anticuerpo terapéutico específico a Her2/neu, *por ejemplo*, Ch4D5, y un anticuerpo de la invención; *por ejemplo*, el quimérico 2B6 o 3H7 como se describió *arriba*. Preferentemente, los anticuerpos se inyectan a cada uno 4 μg por gramo de peso corporal del ratón (mbw). La inyección inicial se seguirá con inyecciones semanales a 2 μg /semana 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 el anticuerpo terapéutico pero se inyectará con un 4D5 quimérico que comprende una mutación N297A e IgG1 humana como anticuerpos control de isotipo para los anticuerpos antitumorales y anti-Fc γ RIIB, respectivamente. Los ratones se pueden colocar en grupos de 4 y controlar tres veces por semana.

La Tabla 3 más abajo es una disposición ilustrativa para estudios de depuración tumoral de acuerdo con la invención. Como se muestra en la Tabla 3, serán necesarios seis grupos de 8 ratones cada uno para probar el papel de un anticuerpo de la invención en la depuración tumoral en donde se usa una combinación de célula objetivo y efectora y en donde se usan dos combinaciones diferentes de concentración de 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-Fc γ RII; en el grupo E, se inyectan células tumorales, monocitos y un anticuerpo anti-Fc γ RIIB; en el grupo F, se inyectan células tumorales, monocitos, Ch4D5 (N297Q) e IgG1 humana. El experto en la técnica apreciará que pueden probarse varias concentraciones de anticuerpo de varias combinaciones de anticuerpos en los modelos tumorales descritos. Preferentemente, se llevan a cabo estudios usando una línea celular de cáncer de mama, *por ejemplo*, SKBR3, en paralelo al experimento descrito anteriormente.

Tabla 3: disposición experimental ilustrativa en ratones

5	8 ratones/grupo	tumor celular s.c día 0	monocitos i.p en el día 1	ch4D5 a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch4D5 N297Q a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch2B6 N297Q a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	IgG1 humana a 4µg/gm de mbw día 1 i.p
	a	+	-	-	-	-	-
10	B	+	+	-	-	-	-
	C	+	+	+	-	-	-
	D	+	+	+	-	+	-
15	E	+	+	-	-	+	-
	F	+	+	-	+	-	+

20 El criterio de valoración de los modelos tumorales de xenoinjerto se determina basándose en el tamaño de los tumores, peso de ratones, tiempo de supervivencia y examen histoquímico e histopatológico del cáncer, usando métodos conocidos por el experto en la técnica. Cada uno de los grupos de ratones de la Tabla 3 será evaluado. Preferentemente, los ratones se controlan tres veces por semana. Los criterios para el crecimiento tumoral pueden ser la distensión abdominal, presencia de masa palpable en la cavidad peritoneal. Preferentemente, se calcularán estimaciones del peso del tumor frente a los días después de la inoculación. Una comparación de los criterios mencionados anteriormente de los ratones del grupo D en comparación con los de otros grupos definirá el papel de un anticuerpo de la invención en la mejoría de la depuración del tumor. Preferentemente, los animales tratados con anticuerpo estarán bajo observación durante otros 2 meses más que el grupo de control.

30 En ejemplos alternativos, pueden usarse ratones "knock in" con FcγRIIB humano que expresan FcγRIIB humano en células efectoras murinas para establecer la actividad *in vivo* de los anticuerpos de la invención, en lugar de células efectoras que se transfieren adoptivamente. Los ratones fundadores que expresan el FcγRIIB humano pueden generar por "knocking in" el FcγRIIB humano en el locus de FcγRIIB de ratón. Después, los fundadores pueden retro-cruzarse con el antecesor desnudo y expresarán el receptor FcγRIIB humano. Las células efectoras murinas resultantes expresarán receptores endógenos FcγRI y FcγRIIIA activadores y FcγRIIB humano inhibidor.

35 La actividad *in vivo* de los anticuerpos humanizados de la invención puede probarse además en un modelo murino de xenoinjerto con células derivadas de tumor primario humano, tales como células derivadas de carcinoma primario humano de mama y ovario. Pueden probarse muestras de ascitis y derrame pleural de pacientes con cáncer para la expresión de Her2/neu, usando métodos conocidos por el experto en la técnica. Muestras de pacientes con carcinoma de ovario se pueden procesar mediante sedimentación por centrifugación de la ascitis a 6370 g durante 20 minutos a 4 °C, lisar los glóbulos rojos y lavar las células con PBS. Una vez que se determina la expresión de Her2/neu en las células tumorales, pueden seleccionarse dos muestras, una con una expresión mediana y otra alta, para la inoculación s.c. durante el establecimiento del modelo tumoral de xenoinjerto. Después, las células tumorales aisladas se inyectarán i.p. en los ratones para expandir las células. Pueden inyectarse aproximadamente 10 ratones i.p. y cada ascitis de ratón pasarse a dos ratones para obtener ascitis de un total de 20 ratones que pueden usarse para inyectar un grupo de 80 ratones. Las muestras de derrame pleural pueden procesarse usando un método 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.

50 En algunos ejemplos, si el porcentaje de células neoplásicas es bajo en las muestras de ascitis o derrame pleural en comparación con otros subconjuntos celulares, las células neoplásicas puede expandirse *in vitro*. En otras modalidades, las células tumorales pueden purificarse usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo CC49 (anti-TAG-72) como se describió anteriormente, *ver, por ejemplo*, Barker y otros, 2001, *Gynecol. Oncol.* 82:57, 63. En resumen, pueden usarse perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo CC49 para separar las células tumorales de ovario que se desprenderán de las perlas mediante una incubación a 37 °C durante la noche. En algunos ejemplos, 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 células tumorales.

60 En otros ejemplos, pueden usarse otros marcadores tumorales además de Her2/neu para separar las 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 informó recientemente de que CD44 (una molécula de adhesión), B38.1 (un marcador específico de cáncer de mama/ovario), CD24 (una molécula de adhesión), pueden usarse como marcadores *ver, por ejemplo*, Al Hajj, y otros, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 100:3983, 8; la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Una vez que se purifican las células tumorales pueden inyectarse s.c. en los ratones para expandirlas.

5 Preferentemente, para analizar las características estructurales de la neoplasia se realiza inmunohistoquímica e
 10 histoquímica en la ascitis y derrame pleural de pacientes. Estos métodos se conocen por el experto en la técnica y se
 abarcan dentro de la invención. Los marcadores que pueden controlarse incluyen, por ejemplo, citoqueratina (para
 identificar células neoplásicas de ovario y mesoteliales a partir de células inflamatorias y mesenquimales); calretinina
 (para separar células mesoteliales a partir de células neoplásicas positivas a Her2neu); y CD45 (para separar células
 inflamatorias del resto de la población celular de las muestras). Los marcadores adicionales que pueden seguirse
 incluyen CD3 (células T), CD20 (células B), CD56 (células NK) y CD14 (monocitos). Se apreciará por el experto en la
 técnica que los métodos de inmunohistoquímica e histoquímica descritos *arriba*, se aplican de modo análogo a cualquier
 célula tumoral para su uso en los métodos descritos en la presente. Después de la inoculación s.c de células tumorales,
 los ratones se chequean para los cambios clínicos y anatómicos. En caso necesario, pueden realizarse autopsias de los
 ratones para correlacionar la carga tumoral total con la localización específica en el órgano.

15 En un ejemplo específico, se establecen los tumores usando las líneas de células de carcinoma tales como las células
 IGROV-1, OVCAR-8, SK-B, y OVCAR-3 y ascitis y derrame pleural de carcinoma de ovario humano a partir de
 pacientes con cáncer de mama. Preferentemente, la ascitis contiene tanto los efectores como los objetivos tumorales
 para los anticuerpos que están a prueba. Monocitos humanos se transferirán como efectores.

20 La actividad *in vivo* de los anticuerpos humanizados de la invención puede probarse además en un modelo animal, *por*
ejemplo, ratones desnudos Balb/c, inyectados con células que expresan FcγRIIB, que incluyen pero sin limitarse a SK-
 BR-3 con número de acceso a ATCC HTB-30 (*ver, por ejemplo*, Tremp y otros, 1976, Cancer Res. 33-41); linfocitos-B;
 células derivadas de linfoma de Burkitts, *por ejemplo*, células de Raji con número de acceso a ATCC CCL-86 (*ver, por*
ejemplo, Epstein y otros, 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), células Daudi con número de acceso a ATCC CCL-
 213 (*ver, por ejemplo*, Klein y otros, 1968, Cancer Res. 28: 1300-10); líneas celulares de carcinoma de ovario, *por*
 25 *ejemplo*, OVCAR-3 con número de acceso a ATCC HTB-161 (*ver, por ejemplo*, Hamilton, Young y otros, 1983), SK-OV-
 3, PA-1, CAOv3, OV-90, y IGROV-1 (disponible del depósito de NCI Benard y otros, 1985, Cancer Research, 45:4970-
 9).

30 Un ensayo ilustrativo para medir la actividad *in vivo* de los anticuerpos humanizados de la invención puede comprender
 lo siguiente: ratones hembras desnudos Balb/c (Taconic, MD) se inyectan en el día 0 con células que expresan FcγRIIB
 tal como 5×10^6 células de Daudi por ejemplo por la vía subcutánea. Después los ratones (*por ejemplo*, 5 ratones por
 grupo) reciben la inyección i.p. de un anticuerpo anti-FcγRIIB humanizado de la invención (*por ejemplo* un h2B6 de la
 invención, *por ejemplo*, a 10 µg/g), inyección i.p. de PBS (control negativo), ch 4.4.20 (anticuerpo anti-FITC) como un
 control negativo, y como un control positivo otro anticuerpo terapéutico contra el cáncer tales como los descritos en la
 35 presente, *por ejemplo*, Rituxan, (*por ejemplo*, a 10 µg/g) una vez por semana iniciando en el día 0. Los ratones se
 observan, *por ejemplo*, dos veces por semana seguido la inyección, y se determina el tamaño del tumor (longitud y
 anchura) usando por ejemplo un calibre. El peso tumoral en mg se estima usando la fórmula: $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$.

40 Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la invención tienen una eficacia mejorada al disminuir el tumor con
 relación a un anticuerpo terapéutico contra el cáncer cuando se administra en la misma dosis, *por ejemplo*, 10 µg/g,
 durante un periodo de tiempo de al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, o al menos 35 días. En la
 mayoría de las modalidades preferidas, los anticuerpos humanizados de la invención reducen el tamaño del tumor en al
 menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces con relación a la administración de un anticuerpo
 45 terapéutico contra el cáncer a la misma dosis. Aun en otra modalidad preferida, los anticuerpos de la invención suprimen
 completamente el tumor.

6.2.2 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

50 La presente invención incluye además polinucleótidos que codifican los anticuerpos humanizados de la invención. En la
 presente se describe el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo 2B6, con número de acceso a
 ATCC PTA-4591 y/o el polinucleótido que codifica la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos sec. con
 núm. de ident.:70. Como un ejemplo específico de acuerdo con esta modalidad, la invención abarca la secuencia
 polinucleotídica sec. con núm. de ident.:69, que codifica la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:70. En la
 presente se describe el polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo 2B6 con número de acceso a ATCC
 55 PTA-4591 y/o el polinucleótido que codifica la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de
 ident.:66. Como un ejemplo específico, la invención abarca la secuencia polinucleotídica sec. con núm. de ident.:65, que
 codifica la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.:66. En un ejemplo específico, la descripción abarca el
 plásmido pMGx0675 que comprende las secuencias nucleotídicas sec. con núm. de ident.:69 y sec. con núm. de
 60 ident.:65 que codifican las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (sec. con núm. de ident.:70) y cadena ligera
 (sec. con núm. de ident.:66), respectivamente, de un ejemplo específico de un anticuerpo h2B6 descrito en la presente,
 cuyo plásmido tiene el número de acceso a ATCC PTA-7609, y se depositó el 23 de mayo de 2006.

65 Los métodos de la descripción abarcan además polinucleótidos que hibridan bajo varias condiciones de rigurosidad *por*
ejemplo, alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja, de los polinucleótidos que codifican un anticuerpo humanizado
 de la invención. La hibridación puede llevarse a cabo bajo varias condiciones de rigurosidad. En forma de ejemplo y sin

limitación, los procedimientos que usan condiciones de baja rigurosidad son los siguientes (ver *además* Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 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 desnaturalizado. 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 por 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 1.5 horas más a 60 °C. Los filtros se secan con tejido absorbente y exponen para autorradiografía. En caso necesario, los filtros se lavan por tercera vez a 65-68 °C y se exponen de nuevo a la película. Otras condiciones poco rigurosas que pueden usarse son bien conocidas en la técnica (*por ejemplo*, como las empleadas para hibridaciones entre especies cruzadas). En forma de ejemplo y sin limitación, los procedimientos que usan condiciones muy rigurosas son los siguientes. La prehibridación de filtros que contienen ADN se lleva a cabo 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 desnaturalizado. 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 desnaturalizado 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 se sigue con un lavado en SSC 0.1X a 50 °C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Otras condiciones de alta rigurosidad que pueden usarse son bien conocidas en la técnica. La selección de condiciones apropiadas para tales rigurosidades es bien conocida en la técnica (*ver por ejemplo*, Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; *ver además*, Ausubel y otros, eds., en el Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, © 1987-1997, Current Protocols, © 1994-1997 John Wiley y Sons, Inc.; *especialmente ver*, Dyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis," En: Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Vol. 2, T.A. Brown, ed., págs. 111-156, IRL Press en Oxford University Press, Oxford, RU.

Oxford University Press.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo humanizado de la invención puede generarse a partir del ácido nucleico de una fuente adecuada (*por ejemplo*, una genoteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente ARN poli A+, aislado a partir de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención, *por ejemplo*, 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 en la secuencia génica en particular para identificar, *por ejemplo*, 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 método bien conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de las secuencias nucleotídicas, *por ejemplo*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. (*ver*, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y otros, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y otros, eds., 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 otra modalidad, las genotecas humanas o cualquiera de las otras genotecas disponibles en la técnica, se pueden tamizar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención.

6.2.3 Expresión recombinante de los anticuerpos

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo humanizado de la invención, puede producirse el vector para la producción del anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica, *por ejemplo* el vector pMGx0675, que codifica la cadena pesada y ligera de un anticuerpo h2B6 de la invención, depositado en ATCC el 23 de Mayo de 2006 y que tiene número de acceso PTA-7609. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo humanizado y señales adecuadas de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, *in vitro* técnicas de ADN recombinante, técnicas sintéticas, e *in vivo* recombinación genética. (*Ver*, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y otros, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel y otros eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo humanizado de la invención puede

transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales (*por ejemplo*, electroporación, transfección liposómica y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo de la invención. En modalidades específicas, la expresión del anticuerpo humanizado se regula con un promotor constitutivo, uno inducible o uno específico de tejido.

Las células huésped usadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula completa de inmunoglobulina recombinante. En particular, las células de mamífero tal como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento intermedio principal del promotor génico temprano del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking y otros, 1998, Gene 45:101; Cockett y otros, 1990, Bio/Technology 8:2) (ver párrafo 147). Preferentemente, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) deficiente de dihidrofolato reductasa, *por ejemplo*, una célula CHO Lee 13 (línea celular CHO mutante resistente a lecitina; (ver, *por ejemplo*, publicación de patente de Estados Unidos núm. 2003/0115614; publicación del PCT núm. WO 00/61739; solicitud de patente europea EP 1 229 125; Ribka & Stanley, 1986, Somatic Cell & Molec. Gen. 12(1): 51-62; Ripka y otros, 1986 Arch. Biochem. Biophys. 249(2): 533-45), o una célula CHO-K1, una célula DUX-B11, una célula CHO-DP12 o una célula CHO-DG44, que se modificó de manera que el anticuerpo no está sustancialmente fucosilado.

Una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped pueden ser utilizados para expresar los anticuerpos humanizados de la invención. Estos sistemas de expresión del huésped representan vehículos en los que pueden producirse las secuencias codificantes de los anticuerpos humanizados y posteriormente purificarse, pero representan además las células que pueden, cuando transfectadas o transformadas con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, expresar los anticuerpos humanizados de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias (*por ejemplo*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de inmunoglobulina; levadura (*por ejemplo*, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo*, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo*, virus de mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (*por ejemplo*, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de inmunoglobulina (*por ejemplo*, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (ver U.S. 5,807,715), células Per C.6 (células de retina de rata desarrolladas por Crucell)) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (*por ejemplo*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (*por ejemplo*, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En células huésped de mamíferos, se pueden utilizar una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, *por ejemplo*, 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 viral (*por ejemplo*, región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados. (*por ejemplo*, ver Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81:355-359). Las señales de iniciación específicas pueden ser necesarias además para la traducción eficaz de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las 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 exógenas y codones de iniciación pueden proceder de una variedad de orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión puede mejorarse por la inclusión de elementos adecuados potenciador de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. (ver Bittner y otros, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (*por ejemplo*, glucosilación) y procesamiento (*por ejemplo*, 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 modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína exógena expresada. Para esta finalidad, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Estas células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitarse 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 de alto rendimiento, a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden genéticamente manipularse las líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo

humanizado de la invención. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral, las células huésped pueden transformarse con el ADN controlado mediante elementos de control de la expresión adecuados (*por ejemplo*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. A continuación de la introducción del ADN exógeno, se pueden dejar crecer las células genéticamente manipuladas 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 el plásmido de forma estable dentro de sus cromosomas y crecer para formar focos, que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse favorablemente para manipular genéticamente las líneas celulares que expresan los anticuerpos de la invención. Estas líneas celulares genéticamente manipuladas pueden ser particularmente útiles en el tamizaje y evaluación de los compuestos que interactúan directamente o indirectamente con los anticuerpos de la invención.

Pueden usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler y otros, 1977, *Cell* 11:223), de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202), y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y otros, 1980, *Cell* 22:817) pueden emplearse en las células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y otros, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77:357; O'Hare y otros, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & 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* 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de ingeniería genética pueden usarse como se describe en Ausubel y otros (eds.), 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 otros (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin y otros, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1; e higr, que confiere resistencia a higromicina (Santerre y otros, 1984, *Gene* 30:147).

Los niveles de expresión de un anticuerpo humanizado de la invención pueden incrementarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, *ver* Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987). Cuando es amplificable un marcador del sistema vector que expresa un anticuerpo, el incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula 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 se incrementará también (Crouse y otros, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, lo cual permite la expresión similar de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, puede usarse un vector sencillo que codifica polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera, *por ejemplo* pMGx0675 que codifica la cadena pesada y ligera de un anticuerpo h2B6 de la invención, con número de acceso a ATCC PTA-7609, depositado el 23 de Mayo de 2006. En tales situaciones, la cadena ligera debe situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxico (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que el anticuerpo humanizado de la invención se expresó de forma recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, *por ejemplo*, mediante cromatografía (*por ejemplo*, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad del antígeno específico después de proteína A y en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

6.3 Métodos profilácticos y terapéuticos

La presente descripción abarca terapias a base de anticuerpos que implican administrar uno o más de los anticuerpos humanizados de la invención a un animal, preferentemente un mamífero, y con máxima preferencia un humano, para evitar, tratar o mejorar síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, asociado con los niveles anormales o actividad de FcγRIIB y/o tratable alterando la función inmunitaria asociada con la actividad de FcγRIIB o mejorando la actividad citotóxica de un segundo anticuerpo terapéutico o mejorando la eficacia de una composición de vacuna o ruptura de la tolerancia de un antígeno. En algunos ejemplos, el tratamiento mediante la administración de uno o más anticuerpos de la invención se combina con la administración de una o más terapias, tales como, pero sin limitarse a, quimioterapias, radioterapias, terapias hormonales y/o terapias biológicas/inmunoterapias.

Se encontró que FcγRIIB (CD32B) se expresaba en los siguientes tipos de tejido: adiposo, célula-b, óseo, cerebro, cartílago, colon, endocrino, ocular, feto, tracto gastrointestinal, genitourinario, célula germinativa, cabeza y cuello, riñón,

5 pulmón, ganglio linfático, linforeticular, glándula mamaria, músculo, nervioso, ovario, páncreas, islote pancreático, glándula pituitaria, placenta, retina, cutáneo, tejido blando, sinovial, y útero (datos recogidos a partir del Proyecto de Anatomía del Genoma del Cáncer del Instituto Nacional de Cáncer). Así, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse para agonzar o antagonizar la actividad de FcγRIIB en cualquiera de esos tejidos. Por ejemplo, FcγRIIB se expresa en la placenta y puede desempeñar un papel en el transporte de IgG al feto y también en la depuración de complejos inmunes (Lyden y otros, 2001, J. Immunol. 166:3882-3889). En ciertas modalidades de la invención, un anticuerpo FcγRIIB humanizado se puede usar como un agente abortivo.

10 Los compuestos profilácticos y terapéuticos de la invención incluyen, pero sin limitarse 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 de cadena simple, ARN bicatenario o de cadena simple, 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 genoteca de moléculas sintéticas.

15 Los anticuerpos humanizados pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conocen en la técnica o como se describen en la presente. Como se detalla a continuación, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse en métodos para tratar el cáncer (particularmente para mejorar la inmunoterapia pasiva o la eficacia de una vacuna contra el cáncer), enfermedad autoinmunitaria, trastornos inflamatorios o alergias (*por ejemplo*, para mejorar a eficacia de una vacuna para el tratamiento de la alergia).

20 Los anticuerpos humanizados de la presente invención que funcionan como un agente profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad, trastorno, o infección pueden administrarse a un animal, preferentemente, un mamífero y con máxima preferencia un humano, para tratar, evitar o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o infección. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse en conjunto con uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles en el tratamiento, prevención o manejo de una enfermedad, trastorno, o infección asociada con niveles o actividad de FcγRIIB anormales, y/o tratable alterando la función inmunitaria asociada con la actividad de FcγRIIB. En ciertas modalidades, se administran uno o más anticuerpos de la invención a un mamífero, preferentemente un humano, simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos distintos y útiles para el tratamiento del cáncer. La expresión "simultáneamente" 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 humanizados de la invención pueden actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de cualquier otra forma. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben 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 adecuada y por cualquier vía adecuada.

30 En diversas modalidades, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia. En modalidades preferidas, se administran dos o más componentes en la misma visita del paciente

35 Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en la presente descripción se engloban en las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Más aun, la dosificación y frecuencia variarán típicamente 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, peso corporal, respuesta e historial médico anterior del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por el experto en la técnica teniendo en cuenta tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones informadas en la bibliografía y recomendadas en Physician's Desk Reference (56va ed., 2002).

40 Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse ventajosamente también en conjunto con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, proteínas de fusión a Fc, o con linfocinas, citocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10 y TGF-β), que mejoran FcγRIIB, por ejemplo, sirven para aumentar el número o actividad de las células efectoras que interactúan con los anticuerpos y, aumentan la respuesta inmunitaria. En ciertas modalidades, se conjuga una citocina con un anticuerpo anti-FcγRIIB.

45 Los anticuerpos humanizados de la invención ventajosamente pueden usarse además en conjunto con uno o más

fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno o infección, tales como, por ejemplo, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, o agentes antivíricos, por ejemplo, como se detalla en las secciones, 5.3.6 y 5.3.5 más abajo.

6.3.1 Cánceres

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse solos o en conjunto con otros anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para evitar, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o la metástasis de células cancerosas. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse en conjunto con anticuerpos usados en la inmunoterapia del cáncer. La invención describe el uso de los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con otro anticuerpo terapéutico para mejorar la eficacia de dicha inmunoterapia aumentando la potencia de la función efectora del anticuerpo terapéutico *por ejemplo*, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, *etc.* Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los anticuerpos de la invención bloquean FcγRIIB, preferentemente en monocitos y macrófagos y mejoran así los beneficios terapéuticos de una eficacia clínica de anticuerpos específicos de tumor, por ejemplo, mejorando la depuración de los tumores mediada por fcγRs activadores.

Como consecuencia, existe descrito métodos para evitar o tratar el cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, que se administra en conjunto con otro anticuerpo que se une específicamente un antígeno de cáncer y es citotóxico. Los anticuerpos humanizados de la invención son útiles en la prevención o el tratamiento del cáncer, especialmente para potenciar la actividad citotóxica de los anticuerpos terapéuticos específicos al antígeno de cáncer con actividad citotóxica que potencian la destrucción de la célula tumoral con los anticuerpos de la invención y/o mejorar, por ejemplo, la actividad ADCC o actividad CDC de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden administrar con proteínas de fusión a Fc. En una modalidad específica, un anticuerpo humanizado de la invención, cuando se administra solo o en conjunto con un anticuerpo terapéutico citotóxico, inhibe o reduce el crecimiento del tumor primario o la metástasis de células cancerosas en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% en relación con el crecimiento del tumor primario o la metástasis en ausencia de dicho anticuerpo de la invención. En una modalidad preferida, los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con un anticuerpo terapéutico citotóxico inhiben o reducen el crecimiento de un tumor primario o la metástasis de células cancerosas en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% en relación con el crecimiento o metástasis en ausencia de dichos anticuerpos.

La transición de un estado normal a uno maligno es un proceso de múltiples etapas que involucra cambios genéticos y epigenéticos. De hecho, ocurren numerosas modificaciones en los circuitos de regulación celular que facilitan esta progresión que permite a las células tumorales evadir el compromiso de la diferenciación terminal y la inactividad que normalmente regula la homeostasis de tejido. Algunos genes se implicaron en la invasividad y el potencial metastásico de las células cancerosas tales como CSF-1 (factor estimulante de colonias 1 o factor estimulante de colonias de macrófagos) . Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, 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 quizás mediante la secreción de factores angiogénicos, *por ejemplo*, timidina fosforilasa, factor de crecimiento derivado del endotelio vascular; la secreción de factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico, que pueden actuar como un factor paracrino en células tumorales y, así, promover la migración de células tumorales e invasión en los vasos sanguíneos. (*Ver, por ejemplo*, Lin y otros, 2001, J. Exp. Med 193(6): 727-739; Lin y otros, 2002, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasms 7(2): 147-162; Scholl y otros, 1993, Molecular Carcinogenesis, 7: 207-11; Clynes y otros, 2000, Nature Medicine, 6(4): 443-446; Fidler y otros, 1985, Cancer Research, 45: 4714-26).

Más aun se describe el uso de los anticuerpos humanizados de la invención para bloquear la progresión y metástasis de la célula tumoral mediada por macrófagos. Los anticuerpos son particularmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, donde se produce la infiltración en los macrófagos. Los anticuerpos antagonistas son especialmente útiles para controlar, *por ejemplo*, reducir o eliminar, la metástasis de células tumorales, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que se localiza en el sitio tumoral. Los anticuerpos humanizados de la invención se usan solo para controlar la metástasis de la célula tumoral. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los anticuerpos antagonistas, cuando se administran solos unen el FcγRIIB inhibidor en macrófagos y reducen eficazmente la población de macrófagos y, reducen eficazmente la progresión de la célula tumoral. Los anticuerpos antagonistas de la invención reducen o, preferentemente, eliminan los macrófagos que se localizan en el sitio del tumor, ya que FcγRIIB se expresa preferentemente en monocitos y macrófagos activados que incluyen macrófagos que infiltran el tumor. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en el tratamiento de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de CSF-1, que incluyen, pero sin limitarse a, cánceres de mama, uterino y ovárico.

Además se describen anticuerpos humanizados que reducen o eliminan eficazmente las células inmunitarias distintas de macrófagos que expresan FcγRIIB, *por ejemplo*, células dendríticas y células B. La reducción o eliminación eficaz de células inmunitarias usando los anticuerpos de la invención puede encontrarse en el intervalo de una reducción de la población de células inmunitarias de 50%, 60%, 70%, 80%, preferentemente 90%, y con máxima preferencia 99%. Por

tanto, los anticuerpos humanizados de la invención tienen eficacia terapéutica mejorada ya sea solos o en conjunto con un segundo anticuerpo, *por ejemplo*, un anticuerpo terapéutico, tales como anticuerpos antitumorales, anticuerpos antiviricos y anticuerpos antimicrobianos. En algunas modalidades, los anticuerpos terapéuticos tienen especificidad por una célula de cáncer o una célula inflamatoria. En otras modalidades, el segundo anticuerpo se une a una célula normal. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, cuando los anticuerpos de la invención se usan solos para suprimir las células inmunitarias que expresan FcγRIIB, la población de células se redistribuye tal que las células que permanecen eficazmente tienen los receptores Fc activadores y se alivia así la supresión por FcγRIIB. Cuando se usa en conjunto con un segundo anticuerpo, *por ejemplo*, un anticuerpo terapéutico, la eficacia del segundo anticuerpo se mejora aumentando la función efectora mediada por Fc del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados de la invención y sus fragmentos y métodos de tratamiento descritos en la presente descripción se creen sean eficaces en el tratamiento tanto de cánceres líquidos y sólidos. Por cánceres líquidos se entienden los cánceres de médula ósea, tal como leucemias. Los cánceres sólidos se relacionan generalmente con los cánceres de órganos y/o otros tejidos. Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o evitarse mediante los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse 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 célula pilosa; policitemia vera; linfoma tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples, tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple ardiente, mieloma de secreción intermitente, mieloma osteoesclerótico, leucemia de célula plasmática, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significado incierto; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseo y del tejido conjuntivo, tales como, pero sin limitarse a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de célula gigante, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióístico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, 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 (de célula pequeña) lobular, carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tales 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 del islote celular 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, melanoma ocular, tales como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula escamosa, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres cervicales, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula escamosa 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, tumor de célula germinal y tumor estromal; cáncer esofágicos incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de célula (célula pequeña) de avena; 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 vejiga, 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 de célula no-pequeña, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de célula grande y cáncer de pulmón de célula pequeña; cánceres testiculares, incluyendo, pero sin limitarse a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatoocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata, incluyendo, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiomas y rabdomiosarcoma; 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 léntigo maligno, melanoma acral lentiginoso; cánceres renales, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de célula renal, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de célula transicional (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilm; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de célula transicional, cáncer de célula escamosa, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Adicionalmente, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándula sudoríparas, carcinoma de glándula

sebácea, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares, ver Fishman y otros, 1985, Medicine, 2da Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy y otros, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

5 Como consecuencia, los métodos y composiciones de la invención son útiles además 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 célula escamosa; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Berkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rabdmiocarcoma; 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, rabdmiocarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenodermia pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. Se contempla además que los cánceres causados por alteraciones en la apoptosis pueden tratarse también con los métodos y composiciones de la invención. Estos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En modalidades específicas, los cambios no-proliferativos o malignos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos, se tratan o impiden con los métodos y composiciones de la invención en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas o útero. En otras modalidades específicas, se tratan o impiden el sarcoma, melanoma o leucemia con los métodos y composiciones de la invención.

Los cánceres asociados con los antígenos de cáncer pueden tratarse o evitarse mediante la administración de los anticuerpos de la invención en conjunto con un anticuerpo que se une al antígeno canceroso y que es citotóxico. En una modalidad en particular, los anticuerpos de la invención mejoran el efecto citotóxico mediado por el anticuerpo del anticuerpo dirigido al antígeno de cáncer en particular. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los antígenos de cáncer siguientes pueden tratarse o evitarse con los métodos 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 otros, 1991, Cancer Res. 51(2):48-475), fosfato ácido prostático (Tailor y otros, 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 otros, 1993, Cancer Res. 53:227-230), antígeno asociado con melanoma p97 (Estin y otros, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81 (6):445-44), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl y otros, 1990, J. Exp. Med 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali y otros, 1987, Cancer 59:55-3; Mittelman y otros, 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon y otros, 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 al tumor colorrectal, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata y otros, 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar y otros, 1993, Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn y otros, 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie y otros, 1994, Blood 83:1329-1336), antígeno del linfoma-B humano CD20 (Reff y otros, 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros y otros, 1993, J. Nucl. Med 34:422-430), antígenos específicos de melanoma, tales como gangliósido GD2 (Saleh y otros, 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y otros, 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston y otros, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y otros, 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 antígeno T de virus tumoral de ADN de y antígenos de la envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno oncofetal alfa-fetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom y otros, 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188), antígenos de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom y otros, 1986, Cancer Res. 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee y otros, 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípido, antígeno de cáncer de mama, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens y otros, 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), antígeno de linfocito humano maligno APO-1 (Bernhard y otros, 1989, Science 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314:53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos y el endodermo primario fetal, I (Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39, que se encuentran en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 que se encuentran en el 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, serie E₁ (grupo sanguíneo B) que se encuentran en cáncer pancreático, FC10.2, que se encuentra en células de carcinoma embrionario, 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 EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, 19.9, que se encuentra en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ que se encuentra en las células mieloides, R₂₄ que se encuentra en el melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 que se encuentra en las células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4, que se encuentran en embriones en la etapa celular 4-8. En otra

modalidad, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T a partir de un linfoma cutáneo de células T (ver Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

5 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar en conjunto con cualquiera de los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer conocidos en la técnica que mejoran la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse con cualquiera de los anticuerpos de la Tabla 4, que han demostrado utilidad terapéutica en el tratamiento contra el cáncer. Los anticuerpos humanizados de la invención mejoran la eficacia del tratamiento de los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer mejorando al menos una función efectora mediada por anticuerpos de dichos anticuerpos terapéuticos contra el cáncer. En una modalidad en particular, 10 los anticuerpos humanizados mejoran la eficacia del tratamiento mejorando la cascada dependiente del complemento de dichos anticuerpos terapéuticos contra el cáncer. En otra modalidad de la invención, los anticuerpos humanizados de la invención mejoran la eficacia del tratamiento mejorando la fagocitosis y la opsonización de las células tumorales específicas. En otra modalidad de la invención, los anticuerpos humanizados de la invención mejoran la eficacia del tratamiento mejorando la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC") para la destrucción de las células tumorales específicas. 15

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse además en conjunto con productos basados en los dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, la invención abarca el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en las composiciones de la invención para el tratamiento y/o 20 prevención del cáncer (Ver además Warren y otros, 2002, Semin Oncol., 29(1 Supl 2):93-7; Warren y otros, 2000, Clin Lymphoma, 1(1):57-61, lo cuales se incorporan en la presente como referencia).

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse en conjunto con un anticuerpo terapéutico que no media su efecto terapéutico a través de la destrucción celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. Por ejemplo el uso de los anticuerpos de la invención en conjunto con un anticuerpo terapéutico que induce apoptosis con actividad agonista, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-Fas. Los anticuerpos anti-Fas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, Jo2 (Ogasawara y otros, 1993, Nature 364: 806) y HFE7 (Ichikawa y otros, 2000, Int. Immunol. 12: 555). Aun sin pretender estar limitados por los mecanismos de acción particulares, FcγRIIB se implicó en la promoción de la apoptosis mediada por anti-Fas, *ver, por ejemplo*, Xu y otros, 2003, Journal of Immunology, 171: 562-568. De hecho, el dominio extracelular de FcγRIIB puede servir como un agente de reticulación para receptores Fas, conduciendo a un complejo funcional y promoviendo la apoptosis dependiente de Fas. En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención bloquean la interacción de anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, conduciendo a una reducción de la actividad apoptótica mediada por Fas. Los anticuerpos de la invención que resultan en una reducción de la actividad apoptótica mediada por Fas son particularmente útiles en conjunto con los anticuerpos anti-Fas que tienen efectos colaterales indeseables, *por ejemplo*, hepatotoxicidad. En otras modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención mejoran la interacción de anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, conduciendo a una mejoría de la actividad apoptótica mediada por Fas. La combinación de los anticuerpos de la invención con los anticuerpos terapéuticos que inducen apoptosis con actividad agonista tiene una eficacia terapéutica mejorada. 40

Los anticuerpos terapéuticos que inducen apoptosis descritos en la presente pueden ser específicos para cualquier receptor de muerte conocido en la técnica para la modulación de la ruta apoptótica, *por ejemplo*, la familia receptora de TNFR.

45 Un método para tratar enfermedades con señalización mediada por apoptosis deficiente, *por ejemplo*, cáncer o enfermedad autoinmunitaria, tal como un método para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, dicho método que comprende administrar un anticuerpo de la invención en conjunto con un anticuerpo anti-Fas.

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, la eficacia de los anticuerpos agonistas de la invención 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 demostraron que la expresión de FcγRIIB en células de melanoma modula el crecimiento tumoral por interacción directa con anticuerpos antitumorales (*por ejemplo*, por la unión de la región Fc de los anticuerpos antitumorales) de un modo dependiente de intracitoplásmico (Cassard y otros, 2002, Journal of Clinical Investigation, 110(10): 1549-1557; incorporadas como referencia en su totalidad). 55

En algunas modalidades, la descripción engloba el uso de los anticuerpos de la invención en conjunto con los anticuerpos terapéuticos que se unen inmuno-específicamente a los antígenos tumorales que no se expresan en las propias células tumorales, sino en las células no malignas reactivas, circundantes, de apoyo al tumor, 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 modalidad específica, un anticuerpo de la invención se usa en conjunto con un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno tumoral o una célula endotelial. 60 En una modalidad preferida, un anticuerpo de la invención se usa en conjunto con un anticuerpo que se une 65

inmunoespecíficamente a un antígeno tumoral en una célula de fibroblasto, *por ejemplo*, proteína de activación de fibroblasto (FAP). FAP es una glicoproteína de tipo II homodimérica de 95 KDa que está altamente expresada en los fibroblastos estromales de muchos tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de pulmón, mama y colorrectales. (Ver, *por ejemplo*, Scanlan y otros, 1994; Proc. Natl. Acad. Estados Unidos, 91: 5657-61; Park y otros, 1999, J. Biol. Chem., 274: 36505-12; Rettig y otros, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 3110-3114; Garin-Chesea y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87: 7235-7239). Los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente FAP son conocidos en la técnica y se abarcan dentro de la invención, *ver, por ejemplo*, Wuest y otros, 2001, Journal of Biotechnology, 159-168; Mersmann y otros, 2001, Int. J. Cancer, 92: 240-248; la patente de Estados Unidos núm. 6,455,677.

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, *ver, por ejemplo*, Mills y otros, 1992, Am. Journal of Epidemiol. 122: 66-74; Eriksson y otros, 1995, Allergy 50: 718-722 (cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad)). De hecho, un estudio reciente demostró que cargar células tumorales con IgEs 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 confieren también inmunidad antitumoral a largo plazo, incluyendo la activación del mecanismo efector de la inmunidad innata y la respuesta inmune adaptativa mediada por células T, *ver* Reali y otros, 2001, Cancer Res. 61: 5516-22; la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los anticuerpos antagonistas de la invención pueden usarse en el tratamiento y/o prevención del cáncer en conjunto con la administración de las IgE para mejorar la eficacia de la terapia del cáncer mediada por IgE. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los anticuerpos de la invención mejoran la eficacia terapéutica del tratamiento de tumores con IgE, bloqueando la ruta inhibidora. Los anticuerpos antagonistas de la invención pueden mejorar la eficacia terapéutica de la terapia del cáncer mediada por IgE, (i) mejorando el retraso del crecimiento del tumor; (ii) mejorando la disminución de la velocidad de progresión del tumor; (iii) mejorando el rechazo del tumor; o (iv) mejorando la inmunidad protectora en relación con el tratamiento del cáncer con IgE sola.

Las terapias contra el cáncer y su dosis, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la literatura, *ver, por ejemplo*, Physician's Desk Reference (56va ed., 2002, la cual se incorpora en la presente como referencia).

6.3.2 Tumores malignos de células B

Los anticuerpos agonistas de la invención son útiles para tratar o evitar cualquier tipo de tumores malignos de células B, particularmente, linfoma no hodgkiniano y leucemia linfocítica crónica. Otros tumores malignos de células B incluyen el linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt, linfomas de células del manto, linfomas difusos de células pequeñas hendidas, linfomas más foliculares y algunos linfomas difusos de células B grandes (DLBCL). FcγRIIB, es un objetivo de la desregulación por translocación cromosómica en el linfoma maligno, particularmente en el linfoma no Hodgkin de células B (Ver Callanan M.B. y otros, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 97(1):309-314). Así, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar o evitar cualquier leucemia linfocítica crónica del linaje de células B. Las leucemias linfocíticas crónicas del linaje de células B se revisan por Freedman (Ver revisión por Freedman, 1990, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4:405). Aun sin pretender estar limitado por algún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas de la invención inhiben o evitan los tumores malignos de células B inhibiendo la proliferación y/o activación de células B. Se describe además el uso de los anticuerpos agonistas de la invención en conjunto con otras terapias conocidas (por ejemplo, quimioterapia y radioterapia) en la técnica para la prevención y/o tratamiento de los tumores malignos de células B. Los anticuerpos agonistas de la invención en conjunto con otros anticuerpos conocidos en la técnica pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de tumores malignos de células B. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas de la invención pueden usarse en conjunto con los anticuerpos anti-C22 o anti-CD 19 descritos por Goldenberg y otros (patente de Estados Unidos núm. 6,306,393), anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD33, o anticuerpos anti-CD52.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse además en conjunto con, por ejemplo, Oncoscint (objetivo: CEA), Verluma (objetivo: GP40), Prostascint (objetivo: PSMA), CEA-SCAN (objetivo: CEA), Rituxin (objetivo: CD20), Herceptin (objetivo: HER-2), Campath (objetivo: CD52), Mylotarge (objetivo: CD33), LymphoCide (objetivo: CD22), Lymphocide Y-90 (objetivo: CD22) y Zevalin (objetivo: CD20).

6.3.3 Enfermedad autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias

Los anticuerpos agonistas de la invención pueden usarse para tratar o evitar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. Se describen métodos para evitar, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmunitario o inflamatorio en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos o sus fragmentos de la invención. Se proporcionan además métodos para evitar, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto, que además comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. Se proporcionan además métodos para evitar, tratar o manejar uno o más síntomas asociados con una enfermedad

autoinmunitaria en un sujeto, que además comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.4.5 proporciona los ejemplos no limitativos de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

5 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar además en conjunto con cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria. En la Tabla 4a, se presenta un ejemplo no limitativo de los anticuerpos o proteínas de fusión a Fc que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios y en la Tabla 4B se presenta un ejemplo no limitativo de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o prevención de un trastorno autoinmunitario. Los anticuerpos humanizados
10 de la invención pueden, por ejemplo, mejorar la eficacia del tratamiento de los anticuerpos terapéuticos o proteínas de fusión a Fc presentados en las Tablas 5A y 5B. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos humanizados de la invención pueden mejorar la respuesta inmune en el sujeto que se trata con cualquiera de los anticuerpos o proteínas de fusión a Fc de las Tablas 5A o 5B.

15 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar además en conjunto con por ejemplo, pero no a modo de limitación, Orthoclone OKT3, ReoPro, Zenapax, Simulec, Rituximab, Synagis, y Remicade.

Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse además en conjunto con productos basados en los dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando
20 actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, la invención abarca el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en los métodos y composiciones de la invención para el tratamiento y/o prevención de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios (Weeratna y otros, 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71, el cual se incorpora en la presente como referencia).

25 Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse administrando los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse 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 canal celiaco, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss,
30 penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de crioglobulina, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus mediada por inmunidad o de tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa,
35 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 (incluyendo artritis reumatoide de la piel, ojos, pulmones, corazón, sangre o nervios), 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 vasculitis de dermatitis herpetiforme, vitíligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitarse a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en la presente en la sección 3.1, algunos trastornos autoinmunitarios se asocian 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 pueden caracterizarse también como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden evitarse, tratarse o manejarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad
40 inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. El término artritis se usa generalmente además para describir más allá de los trastornos de la artritis reumatoide, que comúnmente se asocian con la inflamación autoinmunitaria. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos que se pueden evitar, tratar o manejar de acuerdo con los métodos de la invención incluyen la artritis psoriásica, síndrome de Reiter y artritis por espondilitis anquilosante.

El uso de la invención en el contexto de una enfermedad autoinmunitaria (*por ejemplo*, artritis reumatoide) incluye los métodos para tratar las fases agudas de la enfermedad, así como para evitar la recurrencia de los síntomas. La respuesta a los métodos terapéuticos descritos en la presente en el contexto de la enfermedad autoinmunitaria (*por ejemplo*, artritis reumatoide) se puede evaluar con los métodos descritos en la presente o por cualquier método conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, en el caso de la artritis reumatoide, muchos, pero no todas las personas tienen en su sangre anticuerpos contra el factor reumatoideo; sin embargo, la presencia de factor reumatoideo no es definitiva en sí misma para un diagnóstico positivo de la AR ya que se conocen otras condiciones que causan que se produzca el factor reumatoideo. Por lo tanto, el diagnóstico y la evaluación de la artritis reumatoide es más común
60
65

basado en una combinación de factores, incluyendo, pero sin limitarse a: la ubicación y simetría específica de articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez en las articulaciones por la mañana, la presencia de golpes y nódulos debajo de la piel (nódulos reumatoides), resultados de las pruebas de rayos X que sugieren la artritis reumatoide.

5 Los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmunitaria que es más prevalente en un sexo. Por ejemplo, la prevalencia de la enfermedad de Graves en las mujeres se ha asociado con la expresión de FcyRIIB2 (see Estienne y otros, 2002, FASEB J. 16:1087-1092; incorporada en la presente como referencia en su totalidad). En consecuencia, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse para tratar, evitar, mejorar, o manejar la enfermedad de Graves.

10 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar además para reducir la inflamación experimentada por los animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una modalidad específica, un anticuerpo angiogramas la inflamación en un animal en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con relación a la inflamación en un animal que no se le administra dicho anticuerpo. En otra modalidad, una combinación de anticuerpos reducen la inflamación en un animal en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con relación a la inflamación en un animal que no se le administran dichos anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar además para evitar el rechazo de trasplantes.

25 Tabla 4A: Anticuerpos para enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias que se pueden usar en conjunto con los anticuerpos de la invención.

Nombre del anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación coronaria Cardiopulmano
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastía
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Soriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Soriasis

55

ES 2 489 646 T3

	Nombre del anticuerpo	antígeno objetivo	tipo de producto	Isotipo	patrocinadores	Indicación
5	Anti-CD 18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
	Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	rechazo de aloinjerto
	Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	rechazo de aloinjerto
10	Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
	BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Soriasis
	CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn
	CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
15	CDP850	Selectina E	Humanizado		Celltech	Soriasis
	Corsevin M	Fact VII	quimérico		Centocor	Anticoagulante
	D2E7	TNF-alfa	Humano		Abbott	Artritis reumatoide
20	Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
	Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Derrame
	IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	choque tóxico
	ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Soriasis
25	IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Soriasis
	IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
	IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
30	IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/GlaxoSmith Kline	Artritis reumatoide
	IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/Alergia
	Infliximab	TNF-alfa	quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
35	Infliximab	TNF-alfa	quimérico	IgG1	Centocor	Crohn
	LDP-01	beta2- integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Derrame
40	LDP-01	beta2- integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	rechazo de aloinjerto
	LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerativa
45	MAK-195F TNF	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	choque tóxico
	MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centon	trastornos hematológicos autoinmunitarios
	MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/ Genmab	Artritis reumatoide
50	MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Soriasis
	MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
	OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	rechazo de aloinjerto
	OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
55	Orthoclone /anti- CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	rechazo de aloinjerto

Nombre del anticuerpo	antígeno objetivo	tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
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 aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Soriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	rechazo de aloinjerto

Tabla 4B: Anticuerpos y proteínas de fusión a Fc para trastornos autoinmunitarios

Anticuerpo	Indicación	Antígeno objetivo
ABX-RB2		anticuerpo para el antígeno CBL en las células T, células B y células NK anticuerpo completamente humano a partir de Xenomouse
IL1-ra	artritis reumatoide	proteína recombinante anti-inflamatoria
sTNF-RI	enfermedad inflamatoria crónica de artritis reumatoide	receptor del factor de necrosis tumoral soluble a tipo I que bloquea la acción de TNF
5c8 (anticuerpo anti-ligando CD-40)	Ensayos fase II se interrumpieron en octubre de 1999 examinar "eventos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	anti-CD4 primatizado
IDEC 152	Asma	anti-CD23 primatizado
IDEC 114	Soriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn soriasis	anti-CD2
LDP-02 (anti-b7 mAb)	enfermedad inflamatoria del intestino enfermedad de Crohn colitis ulcerativa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
anticuerpo SMART Anti-interferón gamma	Trastornos autoinmunitarios	Anti-interferón gamma
Verteportin	artritis reumatoide	
Thalomid (thalidomida)	lepra - aprobado para el mercado de la enfermedad de Chron artritis reumatoide	inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa)

5	Se1CIDs (fármacos inhibidores selectivos de la citocina)		inhibidores altamente específicos de la enzima fosfodiesterasa tipo 4 (PDE-4) aumenta los niveles de CAMP (monofosfato de adenosina cíclico) activa la proteína quinasa A (PKA) bloquea el factor de la transcripción NK-kB evita la transcripción del gen TNF-a disminuye la producción de TNF-a
10	IMiDs (fármacos inmunomoduladores)	trastornos autoinmunitarios generales	análogos estructurales de la talidomida inhiben a TNF-a
15	MDX-33	trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunitarias púrpura trombocitopenia idiopática (ITP)	anticuerpo monoclonal contra receptores FcRI
		anemia hemolítica autoinmunitaria	
	MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otras autoinmunitarias	anticuerpo monoclonal contra la molécula receptora de CD4
20	VX-497	trastornos autoinmunitarios de esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria del intestino lupus psoriasis	inhibidor de la monofosfato inosina deshidrogenasa (enzima necesaria para fabricar el nuevo ADN y ARN usados en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
25	VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de interleucina-1 beta ICE (enzima de conversión rutas controles que conducen a la respuesta inmune agresiva que regula las citocinas)
30	VX-745	específico a la inflamación involucrada en la señalización química de aparición de la respuesta inmune y progresión de la inflamación	inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógeno quinasa p38MAP
35	Enbrel (etanercept)		objetivos de TNF (factor de necrosis tumoral)
	IL-8		MAB completamente humana contra IL-8 (interleucina 8) (bloquea IL-8 que bloquea la repuesta inflamatoria)
40	5G1.1	artritis reumatoide penfigoide (erupción cutánea peligrosa) soriasis lupus	a C5 complemento inhibidor
45	Apogen MP4		antígeno recombinante destruye selectivamente a las células T asociadas a la enfermedad induce apoptosis células T eliminadas por muerte celular programada dejan de atacar a las células propias del cuerpo de apoptógenos específicos objetivo de células T específicas
50			

6.3.4 Alergia

Se discuten métodos para tratar o evitar un trastorno alérgico mediado por IgE y/o mediado por FcεRI en un sujeto que los necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos agonistas o sus fragmentos de la invención. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los anticuerpos de la invención son útiles para inhibir la activación de mastocitos inducida por FcεRI, que contribuye a las respuestas alérgicas de fase aguda y tardía (Metcalf D. y otros 1997, *Physiol. Rev.* 77:1033; incorporada en la presente como referencia en su totalidad). Preferentemente, los anticuerpos agonistas de la invención tienen una eficacia terapéutica mejorada y/o efectos secundarios reducidos en comparación con los métodos convencionales usados en la técnica para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE. Los métodos convencionales para el tratamiento y/o prevención de los trastornos alérgicos mediados por IgE incluyen, pero sin limitarse a, fármacos antiinflamatorios (por ejemplo, corticoesteroides orales e inhalados para el asma), antihistamínicos (por ejemplo, para rinitis alérgica y dermatitis atópica), cisteinil leucotrienos (por ejemplo, para el tratamiento del asma); anticuerpos anti-IgE; e inmunoterapia o desensibilización específica.

Los ejemplos de respuestas alérgicas mediadas por IgE incluyen, pero sin limitarse a, asma, rinitis alérgica, alergias gastrointestinales, eosinofilia, conjuntivitis, dermatitis atópica, urticaria, anafilaxis o nefritis glomerular.

5 La descripción abarca moléculas, *por ejemplo*, inmunoglobulinas, modificadas por ingeniería genética que forman complejos con FcεRI y FcγRIIB humano, *es decir*, unidas específicamente a FcεRI y FcγRIIB humano. Preferentemente, tales moléculas tienen eficacia terapéutica en trastornos mediados por IgE y FcεRI. Aun sin pretender estar limitados por un mecanismo de acción en particular, la eficacia terapéutica de estas moléculas modificadas por ingeniería genética se debe, en parte, a su capacidad de inhibir la función del mastocito y basófilo.

10 En un ejemplo específico, las moléculas que se unen específicamente FcεRI y FcγRIIB humanos son proteínas quiméricas de fusión que comprenden un sitio de unión para FcεRI y un sitio de unión para FcγRIIB. Estas moléculas pueden modificarse por ingeniería genética de acuerdo con metodologías estándar de ADN recombinante conocidas por un experto en la técnica. En una modalidad específica preferida, una proteína quimérica de fusión para uso en los
15 métodos de la invención comprende una cadena sencilla F(ab') de un anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB de la invención fusionada con una región usada como un puente que enlaza el huFcε con la región C-terminal de la cadena sencilla F(ab') del anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIB. Una proteína quimérica de fusión ejemplar para uso en los métodos de la invención 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 cinco, diez, preferentemente quince aminoácidos de longitud.
20 La longitud del enlazador puede variar para proporcionar la unión óptima de la molécula tanto a FcγRIIB como FcεRI. En una modalidad específica, el enlazador es un enlazador de 15 aminoácidos, que consiste en la secuencia: (Gly₄Ser)₃. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, el péptido flexible enlazador facilita el apareamiento de las cadenas y minimiza el posible repleglamiento y permitirá además que la molécula quimérica alcance a los dos receptores *decir*, FcγRIIB y FcεRI en las células y se entrecruce con ellos. Preferentemente, la
25 molécula quimérica se clona en un vector de expresión de mamífero, *por ejemplo*, pCl-neo, con un promotor compatible, *por ejemplo*, promotor de citomegalovirus. La proteína de fusión preparada de acuerdo con los métodos de la invención contendrá el sitio de unión para FcεRI (C_Hε2C_Hε3) y para FcγRIIB (V_L/C_L-bisagra-V_H/C_H). El ácido nucleico que codifica la proteína de fusión preparada de acuerdo con los métodos de la invención se transfiere, preferentemente, a células 293 y la proteína segregada se purifica usando métodos comunes conocidos en la técnica.

30 La unión de las moléculas quiméricas a FcεRI y FcγRIIB humanos puede evaluarse usando métodos comunes conocidos por el experto en la técnica para determinar la unión a un FcγR. Preferentemente, las moléculas quiméricas de la invención tienen eficacia terapéutica para tratar trastornos mediados por IgE, por ejemplo, inhibiendo la desgranulación dirigida por antígeno e inhibición de la activación celular. La eficacia de las moléculas quiméricas de la
35 invención en el bloqueo de la desgranulación de mastocitos mediada por FcεRI dirigida por IgE puede determinarse en ratones transgénicos, que se han modificado por ingeniería genética para que expresen FcγRIIB humano y FcεRα humano, antes de su uso en humanos.

40 Se discute el uso de anticuerpos biespecíficos para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE y/o mediados por FcεRI. Un anticuerpo biespecífico (AcBs) se une a dos epítopos diferentes, generalmente en antígenos distintos. Los AcBs tienen utilidad clínica potencial y se han usado para enfocar virus, células infectadas víricamente y patógenos bacterianos, así como para suministrar agentes trombolíticos a coágulos sanguíneos (Cao Y., 1998 Bioconj. Chem 9: 635-644; Koelemij y otros, 1999, J. Immunother., 22, 514-524; Segal y otros, Curr. Opin. Immunol., 11, 558-562). La tecnología para la producción de IgGBs y otras moléculas biespecíficas relacionadas está
45 disponible (*ver, por ejemplo*, Carter y otros, 2001 J. of Immunol. Methods, 248, 7-15; Segal y otros, 2001, J. of Immunol. Methods, 248, 7-15, las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que contienen un F(ab') del anticuerpo anti-FcγRIIB y un F(ab') de un anticuerpo monoclonal anti-huIgE disponible que agrega dos receptores, FcγRIIB y FcεRI, sobre la superficie de la misma célula. Cualquier metodología conocida en la técnica y descrita en la presente puede emplearse para generar anticuerpos
50 biespecíficos para su uso en los métodos de la invención. En una modalidad específica, los AcBs se producirán por entrecruzamiento químico de los fragmentos F(ab') de un anticuerpo anti-FcγRIIB y un anticuerpo anti-huIgE como se describió anteriormente (*ver, por ejemplo*, Glennie y otros, 1995, Tumor Immunobiology, Oxford University press, Oxford, pág. 225; la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Los fragmentos F(ab') pueden producirse por proteólisis limitada con pepsina y reducirse con mercaptoetanol amina para proporcionar fragmentos Fab' con grupos sulfhidrilos (SH) libres de la región bisagra. El grupo SH en uno de los fragmentos Fab' (SH) puede
55 alquilarse con un exceso de O-fenilendimaleimida (O-PDM) para proporcionar un grupo maleimida libre (mal). Las dos preparaciones Fab'(mal) y Fab'(SH) pueden combinarse en una proporción adecuada, preferentemente 1:1, para generar constructos heterodiméricos. Los AcBs pueden purificarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño y caracterizarse por HPLC usando métodos conocidos por el experto en la técnica.

60 En particular, la invención abarca anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer par de cadena pesada-cadena ligera que une a FcγRIIB con una afinidad mayor que dicho par de cadena pesada-cadena ligera que une a FcγRIIA y un segundo par de cadena pesada-cadena ligera que une el receptor de IgE, con la condición de que dicho primer par de cadena pesada-cadena ligera une primero a FcγRIIB. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden
65 modificarse por ingeniería genética usando técnicas estándar conocidas en la técnica para asegurar que la unión a

5 FcγRIIB precede a la unión al receptor de IgE. Se entenderá por el experto en la técnica que se modificarán por ingeniería genética los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, tal que dichos anticuerpos biespecíficos unan FcγRIIB con una afinidad mayor que con la que dichos anticuerpos unen al receptor de IgE. Además, los anticuerpos biespecíficos pueden modificarse por ingeniería genética mediante técnicas conocidas en la técnica, tal que el tamaño de la bisagra del anticuerpo puede incrementarse en su longitud, por ejemplo, añadiendo enlazadores, para proporcionar los anticuerpos biespecíficos con flexibilidad para unir el receptor de IgE y el receptor FcγRIIB en la misma célula.

10 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar además en conjunto con otros anticuerpos terapéuticos o fármacos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de los trastornos alérgicos mediados por IgE. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden usar en conjunto 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, Deconamina, 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, Ataraxloratadina, pseudoefedrina, Claritin-D, loratadina, Claritin, prednisolona, Prednisolona, líquido oral Pediapred, 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 además en conjunto con productos basados en los dinucleótidos de citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o se están desarrollando actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, se describe el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceutical) para el tratamiento y/o prevención de los trastornos alérgicos mediados por IgE (Ver además Weeratna y otros, 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71.

25 Se describe además el uso de los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con cualquiera de los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de los trastornos alérgicos, *por ejemplo*, Xolair™ (Omalizumab; Genentech); rhuMAB-E25 (BioWorld Today, 10 de noviembre de 1998, pág. 1; Genentech); CGP-51901 (anticuerpo anti-IgE humanizado), *etc.*

30 Además, se describe el uso de los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con otras composiciones conocidas en la técnica para el tratamiento de los trastornos alérgicos. En particular, los métodos y composiciones descritos en Carson y otros (patente de Estados Unidos núm. 6,426,336; publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2002/0035109 A1 y 2002/0010343.

35 6.3.5 Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

40 Existen métodos discutidos para tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de los anticuerpos de la invención junto con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitarse a, los antibióticos metotrexato, ENBREL, REMICADE™, HUMIRA®, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, y macrólidos (*por ejemplo*, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidadas (*por ejemplo*, leflunamida), moduladores de receptor de células T y moduladores receptores de citocinas.

45 Los agentes antiinflamatorios resultaron exitosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarias 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 métodos de la invención. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metilxantinas. Los ejemplos de NSAIDs incluyen, pero sin limitarse 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 NSAID funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (*por ejemplo*, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero sin limitarse a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

60 6.3.6 Agentes anticancerígenos y anticuerpos terapéuticos

65 Se discute además 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; Benefina; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endostatina (fragmento XVIII de colágeno); bloqueadores/inhibidores de EGFR

(Iressa[®], Tarceva[®], Erbitux[®], y ABX-EGF) fragmento de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de la heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); AcMo IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria, 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-b); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesiltransferasa (FTI); y bisfosfonatos.

Los agentes anticancerígenos que pueden usarse en conjunto con anticuerpos de la invención en las diversas modalidades de la invención incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, pero sin limitarse a: acivicina, aclarrubicina, clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina, altrretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; 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; enloplatin; epromate; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de sodio 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; hidroxiaurea; clorhidrato idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b; interferón alfa-nl; interferón-alfa-n3, interferón beta-I a, interferón gamma-I b; iproplatin; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina, clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedpa; 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; pipsulfano; clorhidrato de piroxantrona; picamicina; plomestano; porfímero de sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbina; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatin; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán de sodio; 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; vapreotida; verteporfina, sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tarttrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; ceniplatin; cinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros fármacos anticancerígenos incluyen, pero sin limitarse a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiratenona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK, altrretamina; 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; benzoilestaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamincina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanoespermina; 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; deshidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexerapamil; diazicuona; didemnina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón, doxilfluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; 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 fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; 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 tipo insulina1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de N-lamelarina; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de
 5 lentinano; leptolstatina; 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; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo;
 10 merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble cadena mal pareado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; 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 multiresistencia a fármacos; terapia a base de supresor tumoral múltiple 1; agente anticancerígeno mostaza;
 15 micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra, nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante nítrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxanomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de
 20 paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactin; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de sodio de pentosán; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol de perillio; fenazinomicina; 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 de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado del polioxietileno de hemoglobina; 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;
 30 rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safangol; saintopina; SarCNU; sarcófito 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 de unión al antígeno de cadena simple, sizofirán, sobuzoxano, borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastina 1, escualamina, inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido superactivo intestinal vasoactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; metiyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano;
 40 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; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica con eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina, vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimálmero de zinostatina. Los fármacos anticancerígenos adicionales preferidos son 5-fluoroacilo y leucovorina.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el
 50 tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico, REOPRO® (abciximab) (Centocor), que es un receptor antiglicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal inmunosupresor anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo agudo de aloinjerto renal; PANOREX™, que es un anticuerpo murino IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2, que es un anticuerpo murino IgG antiidiotípico (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225, que es un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR (ImClone System); VITAXIN™, que es un anticuerpo humanizado anti-integrina $\alpha v \beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03, que es un anticuerpo IgG1 anti-CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195, que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™, que es un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™, que es un anticuerpo 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-TNF- α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech);
 65

5 IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Orto Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β humano₂ (Cambridge Ab Tech).

10 Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en conjunto con los anticuerpos de la invención se presentan en la Tabla 5.

15 Tabla 5: Anticuerpos monoclonales para la terapia del cáncer que pueden usarse en conjunto con los anticuerpos de la invención.

Compañía	Producto	Enfermedad	Objetivo
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomabitrío-90)	cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	blvatuzumab	cáncer cabeza & cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	accidente cerebro vascular isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20

	CRC Technology	MAb, idiopático 105AD7	vacuna del cáncer colorrectal	gp72
5	CruceCell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
	Citoclonal	MAB, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
10	Genentech	Herceptin	cáncer de mama metastásico	HER-2
		Herceptin	cáncer de mama estadio temprano	HER-2
		Rituxan	NHL recidiva/resistente o de bajo grado o folicular	CD20
		Rituxan	NHL intermedio & de alto grado	CD20
15		MAB-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
		MAB-VEGF	cáncer colorrectal metastásico	VEGF
		Fab AMD	Degeneración macular relacionada con la edad	CD18
		E-26 (2 ^{do} gen. IgE)	asma alérgica & rinitis	IgE
20	IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	NHL de células B, de bajo grado o folicular, en recidiva o refractario, positivo a CD-20 y NHL refractario a Rituximab	CD20
	ImClone	Cetuximab + innotecan	carcinoma refractario colorrectal	receptor de EGF
25		Cetuximab + cisplatino & radiación	cáncer de cabeza & cuello diagnosticado recientemente o recurrente	receptor de EGF
		Cetuximab + gemcitabina	carcinoma pancreático metastásico diagnosticado	receptor de EGF
30		Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza & cuello metastásico o recurrente	receptor de EGF
		Cetuximab + carboplatin + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas diagnosticado recientemente	receptor de EGF
35		Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza & cuello (enfermedad regional extensiva incurable local & metástasis distante)	receptor de EGF
		Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza & cuello localmente avanzado	receptor de EGF
40		BEC2 + Bacilo Calmette Guerin	carcinoma de pulmón de célula pequeña	imita gangliósido GD3
		BEC2 + Bacilo Calmette Guerin	Melanoma	imita gangliósido GD3
45		IMC-1C11	cáncer colorrectal con metástasis en hígado	receptor de VEGF
	ImmonoGen	nuC242-DM1	cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
50	ImmunoMedics	LymphoCide	linfoma no-Hodgkins	CD22
		LymphoCide Y-90	linfoma no-Hodgkins	CD22
		CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
55		CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
		CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagenología)	CEA

5		CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de mama (radioimagineología)	CEA
		CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagineología)	CEA
10		CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperativos (radioimagineología)	CEA
		LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección e tejido blando (radioimagineología)	CEA
		LymphoScan (marcado con T-99m)	linfomas (radioimagineología)	CD22
15		AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres hepáticos de célula germinal (radioimagineología)	7 AFP
	Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer cabeza & cuello	NA
		HumaSPECT	imagineología colorrectal	NA
20	Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	próstata y otros cánceres	CTLA-4
		MDX-210 (overexpresión de her-2)	cáncer de próstata	HER-2
		MDX-210/MAK	cáncer	HER-2
25	MedImmune	Vitaxin	cáncer	$\alpha\beta_3$
	Merck KGaA	MAb 425	diversos cánceres	receptor de EGF
		IS-IL-2	diversos cánceres	Ep-CAM
	Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfática crónica	CD52
30	NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	linfoma no-Hodgkins	CD20
		Avidicina (albúmina + NRLU13)	cáncer metastásico	NA
	Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	linfoma no-Hodgkins	HLA-DR 10 beta
35		Cotara (+yodo-131)	glioma maligno no-extirpable	proteínas asociadas a ADN
	Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina de estafilococo)	cáncer pancreático	NA
40		MAb, cáncer de pulmón/riñón	cáncer de pulmón & riñón	NA
		nacolomab tafenatox (C242 + enterotoxina de estafilococo)	+ cáncer de colon & pancreático	NA
	Protein Labs	Design Nuvion	Tumores malignos de células	CD3
45		SMART M195	AML	CD33
		SMART 1D10	NHL	antígeno HLA-DR
	Titan	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
50		TriGem	melanoma metastásico & cáncer de pulmón de célula pequeña	gangliósido GD2
		TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1

5	Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
		TriGem	melanoma metástasis & cáncer de pulmón de célula pequeña	gangliósido GD2
		TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
10	Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado	linfoma no-Hodgkins	NA
		Monopharm C	carcinoma colorrectal & pancreático	antígeno SK-1
		GlioMAb-H (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma & neuroblastoma	NA
15	Xoma	Rituxan	NHL recidiva/resistente o de bajo grado o folicular	CD20
		Rituxan	NHL intermedio & de alto grado	CD20
		ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

6.3.7 Terapia con vacuna y profilaxis

Existe descrito un método para mejorar una respuesta inmunitaria de a una composición vacunal en un sujeto, dicho método que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo humanizado de la invención o un fragmento de este que se une específicamente a FcyRIIB con una afinidad mayor que con la que dicho anticuerpo o un fragmento de este se une a FcyRIIA, y una composición de vacuna, en donde dicho anticuerpo o un fragmento de este mejora la respuesta inmunitaria de dicha composición vacunal. En una modalidad en particular, dicho anticuerpo o un fragmento de este mejora la respuesta inmune frente a dicha composición vacunal mejorando la presentación de antígeno y/o el procesamiento de antígeno al que se dirige la vacuna. Cualquier composición vacunal conocida en la técnica es útil en conjunto con los anticuerpos o sus fragmentos de la invención.

Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los anticuerpos de la invención pueden bloquear la activación de FcyRIIB que se expresa en ciertas poblaciones y/o tipos de células dendríticas y mejorar así la actividad de tales células dendríticas durante la vacunación activa. Esta actividad de las células dendríticas mejorada puede resultar así en una respuesta mejorada o mayor a la vacunación terapéutica o profiláctica.

Se discute además el uso de los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con cualquier vacuna contra el cáncer conocida en la técnica, *por ejemplo*, Carvaxin™ (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 métodos y composiciones descritas en la presente pueden ser, por ejemplo, vacunas específicas de antígeno, vacunas antiidiotípicas, vacunas de células dendríticas o vacunas de ADN. Alternativamente se pueden usar las vacunas contra EGFRviii, variantes de empalme de CD44, y PSMA. La invención abarca el uso de los anticuerpos de la invención con vacunas basadas en célula como descrito por Segal y otros (patente de Estados Unidos núm. 6,403,080, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Las vacunas basadas en células usadas en conjunto con los anticuerpos de la invención pueden ser ya sea autólogas o alogénicas. En resumen, las vacunas basadas en cáncer como se describe por Segal y otros se basan en el producto Oponokine (TM) de Genitrix, LLC. Oponokines™ son citocinas diseñadas por ingeniería genética que, cuando se mezclan con células tumorales, se adhieren 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 crítico en el receptor, mientras que permite también a las células presentadoras de antígeno ingerir las células tumorales. Las células presentadoras de antígeno son capaces entonces de instruir a las células T "citotóxicas" que encuentren y destruyan células tumorales similares en todo el organismo. Así, el producto Oponokine™ convierte las células tumorales en un potente agente inmunoterapéutico antitumoral.

En una modalidad, la invención abarca el uso de los anticuerpos humanizados de la invención en conjunto con cualquier vacuna contra la alergia conocida en la técnica. Los anticuerpos humanizados de la invención, se pueden usar, por ejemplo, en conjunto con moléculas híbridas recombinantes que codifican para 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 otros (2000, FASEB Journal, 16(10):1301-3, la cual se incorpora como referencia). Además, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse en conjunto con vacunas basadas en ADN descrito por Horner y otros (2002, Allergy, 57 Supl, 72:24-9, la cual se incorpora como referencia). Los anticuerpos de la invención pueden usarse en conjunto con la vacuna del Bacilo de Calmette-Guérin ("BCG") como se describe por Choi y otros (2002, Ann. Allergy Asthma Immunology, 88(6): 584-91) y Barlan y otros (2002, Journal Asthma, 39(3):239-46), los cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad, para regular negativamente la secreción de IgE. Los anticuerpos humanizados de la invención son útiles para tratar alergias alimentarias. En particular, los anticuerpos humanizados de la invención pueden usarse en conjunto con vacunas u otras inmunoterapias conocidas en la técnica (ver Hourihane y otros, 2002, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(3):227-31) para el tratamiento de alergias al cacahuete.

Los métodos y composiciones de la invención pueden usarse en conjunto con vacunas, en las que se desea inmunidad del (los) antígeno(s). Estos antígenos pueden ser cualquier antígeno conocido en la técnica. Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden usar para mejorar una respuesta inmune, por ejemplo, contra agentes infecciosos, células enfermas o anormales tales como, pero sin limitarse a, bacteria (*por ejemplo*, bacteria gram positiva bacteria, bacteria gram negativa, bacteria aeróbica, espiroquetas, micobacteria, rickettsias, clamidias, *etc.*), parásitos, hongos (*por ejemplo*, *Candida albicans*, *Aspergillus*, *etc.*), virus (*por ejemplo*, virus de ADN, virus de ARN, *etc.*), o tumores. Las infecciones virales incluyen, pero sin limitarse 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 (RSV), virus parainfluenza (PIV), virus de Epstein Barr, metapneumovirus (HMPV), virus influenza, Síndrome Respiratorio Agudo Severo(SARS) o cualquiera otras infecciones virales.

La invención abarca los métodos y composiciones vacunal que comprenden las combinaciones de un anticuerpo humanizado de la invención, un antígeno y una citocina. Preferentemente, la citocina es IL-4, IL-10, o TGF- β .

La invención abarca el uso de los anticuerpos humanizados de la invención para mejorar una respuesta humoral y/o mediada por células frente al/a los antígeno(s) de la composición vacunal. Más aun la invención abarca el uso de los anticuerpos humanizados de la invención ya sea para evitar o tratar un trastorno en particular, en el que una respuesta inmunitaria frente a un antígeno o antígenos en particular es eficaz para tratar o evitar la enfermedad o trastorno. Estas enfermedades y trastornos incluyen, pero sin limitarse a, infecciones virales, tales como VIH, CMV, hepatitis, herpes virus, sarampión, *etc.*, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y parasitarias, cánceres y cualquier otra enfermedad o trastorno susceptibles al tratamiento o prevención mejorando una respuesta inmune frente a un antígeno o antígenos en particular.

6.3.8 Ruptura de la tolerancia a un antígeno

Ciertos cánceres pueden estar asociados con la capacidad de los tumores para eludir una respuesta inmune contra sus antígenos, *es decir*, existe la tolerancia a estos antígenos. Ver Mapara y otros, 2004, J. Clin. Oncol. 22:1136-1151. Como consecuencia, una meta en la inmunoterapia de tumor es romper la tolerancia a los antígenos tumorales para inducir una respuesta antitumoral. Inducir una respuesta inmune contra un antígeno extraño que es reconocido de cualquier otra forma por el huésped como un "auto" antígeno rompe la tolerancia a ese antígeno.

Así, se describe un método para romper la tolerancia a un antígeno en un paciente mediante su administración a un paciente que lo necesita (1) un complejo antígeno-anticuerpo que comprende el antígeno y (2) un anticuerpo humanizado o fragmento de este que une específicamente el dominio extracelular de Fc γ RIIB y bloquea el sitio de unión a Fc del Fc γ RIIB humano, rompiendo de ese modo la tolerancia de dicho paciente al antígeno. El anticuerpo humanizado o su fragmento se pueden administrar antes, simultáneamente con, o después de la administración de dicho complejo antígeno-anticuerpo.

Células presentadoras de antígenos, tal como las células dendríticas, coexpresan receptores gamma Fc activadores e inhibidores. Sin estar limitado por la teoría, cuando los anticuerpos que bloquean la unión de Fc a Fc γ RIIB están presentes, los complejos antígeno-anticuerpo que comprenden un antígeno se aceptan principalmente por receptores no inhibidores en las células presentadoras de antígeno induciendo una respuesta inmune al antígeno.

El antígeno puede ser un antígeno que está asociado con un cáncer o una enfermedad neoplásica, el antígeno puede ser específico a una célula de cáncer o una célula neoplásica. El antígeno también puede ser un antígeno de un patógeno, tales como, *por ejemplo*, un virus, una bacteria o un protozoo. Antígenos representativos se describieron en la presente invención.

6.4 Composiciones y métodos de administración

La invención proporciona métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos humanizados de la invención. Se describen además métodos de tratamiento, profilaxis y mejoría 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 de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o moléculas conjugadas de la invención. 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 modalidad específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas *etc.*) y un primate (*por ejemplo*, mono tales como, un mono cangrejero y un humano). En una modalidad preferida el sujeto es un humano.

Se conocen y pueden usarse diversos sistemas de entrega para administrar una composición que comprende anticuerpos humanizados de la invención, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (*ver*,

por ejemplo, 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.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados de la invención se formulan en liposomas para la entrega dirigida de los anticuerpos de la invención. Los liposomas son vesículas que constan de bicapas de fosfolípidos concéntricamente ordenadas que encapsulan una fase acuosa. Los liposomas comprenden típicamente diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos. Los componentes de los liposomas se disponen en una configuración de bicapa, similar al arreglo de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas son vehículos de entrega especialmente preferidos, debido, en parte, a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y baja toxicidad. Métodos para la preparación de liposomas se conocen en la técnica y se abarcan dentro de la invención, *ver, por ejemplo*, Epstein y otros, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82: 3688; Hwang y otros, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77: 4030-4; las patentes de Estados Unidos núms. 4,485,045 y 4,544,545.

15 La invención también abarca además los métodos de preparación de liposomas con una media vida en suero prolongada, *es decir*, un tiempo de circulación mejorado, tales como aquellos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 5,013,556. Los liposomas preferidos usados en los métodos humanizados de la invención no se eliminan rápidamente de la circulación, *es decir*, no se incorporan en el sistema fagocítico mononuclear (MPS). La invención abarca liposomas estéricamente estabilizados que se preparan usando métodos comunes conocidos por el experto en la técnica. Aun sin pretender estar limitado por un mecanismo de acción en particular, los liposomas estéricamente estabilizados contienen componentes lipídicos con porciones hidrófilas voluminosas 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 MPS. Los liposomas estéricamente estabilizados se preparan, preferentemente, usando polietilenglicol. Para la preparación de liposomas y liposomas estéricamente estabilizados, *ver, por ejemplo*, Bendas y otros, 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224; Allen y otros, 1987 FEBS Lett. 223: 42-6; Klivanov y otros, 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum y otros, 1990, Biochim. Biophys. Acta., 1029: 91-7; Torchilin y otros, 1996, J. Liposome Res. 6: 99-116; Litzinger y otros, 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama y otros, 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klivanov y otros, 1991, Biochim Biophys Acta, 1062: 142-8; Allen y otros, 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309. La invención abarca además liposomas que se adaptan para dirigirse a órganos específicos, *ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 4,544,545, o dirigirse a células específicas, *ver, por ejemplo*, publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2005/0074403. Pueden generarse liposomas especialmente útiles para su uso en las composiciones y métodos de la invención mediante un método de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrudidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. En algunas modalidades, un fragmento de un anticuerpo de la invención, *por ejemplo*, F(ab'), puede conjugarse a los liposomas usando métodos previamente descritos, *ver, por ejemplo*, Martin y otros, 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288.

40 Los anticuerpos humanizados de la invención pueden formularse además como inmunoliposomas. Los inmunoliposomas se refieren a una composición del liposoma, en donde un anticuerpo de la invención o un fragmento de este se enlaza, covalentemente o no covalentemente, a la superficie del liposoma. La química de enlazar un anticuerpo a la superficie del liposoma se conoce en la técnica y se abarca dentro de la invención, *ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,787,153; Allen y otros, 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen y otros, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239: 133-44. En modalidades más preferidas, los inmunoliposomas para uso en los métodos y composiciones humanizados de la invención adicionalmente se estabilizan estéricamente. Preferentemente, los anticuerpos humanizados de la invención están enlazados covalentemente o no covalentemente a un anclaje hidrofóbico, que está insertado de forma estable en la bicapa lipídica del liposoma. Los ejemplos de anclajes hidrofóbicos incluyen, pero sin limitarse a, fosfolípidos, *por ejemplo*, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI). Para lograr un enlace covalente entre un anticuerpo y un anclaje hidrofóbico, puede usarse cualquiera de las estrategias bioquímicas conocidas en la técnica, *ver, por ejemplo*, 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 hidrofóbico asociado con un liposoma, *por ejemplo*, un grupo amino de una cadena lateral de lisina de un anticuerpo puede acoplarse con N-glutaril-fosfatidiletanolamina activada asociado a un liposoma con carbodiimida soluble en agua; o un grupo tiol de un anticuerpo reducido puede acoplarse con liposomas a través de anclajes que reaccionan con tiol tal como piridiltiopropionil-fosfatidiletanolamina. *Ver, por ejemplo*, Dietrich y otros, 1996, Biochemistry, 35: 1100-1105; Loughrey y otros, 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901: 157-160; Martin y otros, 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288; Martin y otros, 1981, Biochemistry, 20: 4429-38. Aun sin pretender estar limitado a un mecanismo de acción en particular, las formulaciones de inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo de la invención son particularmente eficaces como agentes terapéuticos, ya que entregan el anticuerpo al citoplasma de la célula objetivo, *es decir* la célula que comprende el receptor de FcγRIIB al que se une el anticuerpo. Preferentemente, los inmunoliposomas tienen una media vida en sangre aumentada, específicamente se dirigen a las células y pueden internalizarse en el citoplasma de las células objetivo, evitando de ese modo la pérdida de agente terapéutico o degradación mediante la ruta endolisosómica.

65 El invento abarca inmunoliposomas que comprenden un anticuerpo humanizado de la invención o un fragmento de este. En algunas modalidades, los inmunoliposomas comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los descritos en la presente invención.

Las composiciones de inmunoliposomas de la invención comprenden uno o más lípidos formadores de vesículas, un anticuerpo de la invención o un fragmento o derivado de este y, opcionalmente, un polímero hidrófilo. Un lípido formador de vesículas es, preferentemente, un lípido con dos cadenas de hidrocarburo, tales como cadenas acilo, y un grupo de cabeza polar. Los ejemplos de lípidos formadores de vesículas incluyen fosfolípidos, *por ejemplo*, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, esfingomiélin y glicolípidos, *por ejemplo*, cerebrósidos, gangliósidos. Los lípidos adicionales útiles en las formulaciones de la invención son conocidos por el experto en la técnica y se abarcan dentro de la invención. En algunas modalidades, las composiciones de inmunoliposomas comprenden además un polímero hidrófilo, *por ejemplo*, polietilenglicol y gangliósido GM1, que incrementa la media vida en suero del liposoma. Los métodos de conjugación de polímeros hidrófilos con liposomas son bien conocidos en la técnica y se abarcan dentro de la invención. Para una revisión de inmunoliposomas y métodos para prepararlos, *ver, por ejemplo*, publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0044407; publicación internacional PCT núm. WO 97/38731, Vingerhoads y otros, 1994, Immunomethods, 4: 259-72; Maruyama, 2000, Biol. Pharm. Bull. 23(7): 791-799; Abra y otros, 2002, Journal of Liposome Research, 12(1&2): 1-3; Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2): 267-281; Bendas y otros, 2001 BioDrugs, 14(4): 215-224, J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, volumen 40, Academic Press, San Diego, CA., pág. 399-435.

Los métodos para administrar un anticuerpo humanizado de la invención incluyen, pero sin limitarse a, administración parenteral (*por ejemplo*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (*por ejemplo*, vías intranasal y oral). En una modalidad específica, los anticuerpos de la invención 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 (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, la administración pulmonar puede emplearse además, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de atomización. *Ver, por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 6,019,968; 5,985, 20; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y las publicaciones del PCT núms. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La invención proporciona además que los anticuerpos humanizados de la invención se envasan en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolleta o un sobre que indica la cantidad de anticuerpo. En una modalidad, los anticuerpos se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado y pueden reconstituirse, *por ejemplo*, con agua o solución salina hasta la concentración adecuada para su administración a un sujeto. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, con mayor preferencia 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 de la invención deben conservarse a entre 2 y 8 °C en su recipiente original y los anticuerpos deben administrarse dentro de un plazo de 12 horas, preferentemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después que se reconstituyen. En una modalidad alternativa, los anticuerpos se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los anticuerpos se suministran en un recipiente herméticamente cerrado con al menos 1 mg/ml, con mayor preferencia 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, al 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 de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa a ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la seriedad de la afección, y debe ser decidida de acuerdo al criterio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba del modelo animal o *in vitro*.

Para anticuerpos que se abarcan por la invención, la dosificación administrada a un paciente típicamente es de 0.0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación 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 del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una media vida dentro del cuerpo del humano más prolongada que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune frente a los polipéptidos exógenos. Así, es frecuentemente posible, dosificaciones inferiores de anticuerpos humanos y la administración menos frecuente. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención o sus fragmentos pueden reducirse mejorando la captación y penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tal como, por ejemplo, la lipidación.

En una modalidad, la dosificación de los anticuerpos de la invención administrada a un paciente es de 0.01mg a 1000 mg/día, cuando se usan como agente terapéutico único. En otra modalidad, los anticuerpos de la invención se usan en

conjunto 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 modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no en forma 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 de la invención, debe tomarse el cuidado de usar materiales a los que no se absorban el anticuerpo o la proteína de fusión.

En otra modalidad, las composiciones pueden entregarse en una vesícula, particularmente, un liposoma (Ver Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, págs. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibidem., págs. 3 17-327; ver en general, ibidem.).

En aun otra modalidad, las composiciones pueden entregarse en un sistema de liberación controlada o sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,526,938; la publicación del PCT WO 91/05548; la publicación del PCT WO 96/20698; Ning y otros, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song y otros, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek y otros, 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 otros, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized anticuerpo monoclonal for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una modalidad, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (Ver Langer, arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald y otros, 1980, Surgery 88:507; y Saudek y otros, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos para lograr una liberación controlada de los anticuerpos (ver por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver además Levy y otros, 1985, Science 228:190; During y otros, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y otros, 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); la patente de Estados Unidos núm. 5,679,377; la patente de Estados Unidos núm. 5,916,597; la patente de Estados Unidos núm. 5,912,015; la patente de Estados Unidos núm. 5,989,463; la patente de Estados Unidos núm. 5,128,326; la publicación del PCT núm. WO 99/15154; y la publicación del PCT núm. WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitarse 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 (láctida-co-glicólidos) (PLGA) y poliolefinas. En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al objetivo terapéutico (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se describen además las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada que se usan de acuerdo con Dunn y otros (Ver U.S. 5,945,155). Este método en particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo a partir del sistema de polímero. La implantación generalmente puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. Alternativamente, se usa un sistema de entrega sostenido no polimérico, para el que se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como un sistema de entrega del fármaco. Después de la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o se filtrará desde la composición en el fluido del tejido circundante y el material no polimérico coagulará o precipitará de forma gradual para formar una matriz microporosa sólida (Ver U.S. 5,888,533).

Los sistemas de liberación controlados son discutidos en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,526,938; las publicaciones internacionales núms. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning y otros, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song y otros, 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek y otros, 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam y otros, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una modalidad específica en la que la composición de la invención 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 ácido nucleico adecuado y administrándolo tal que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (Ver la patente de Estados Unidos núm. 4,980,286), o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolística, Dupont) o recubriéndolo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, administrándolo enlazado a un péptido de tipo caja homeótica que se conoce que entra en el núcleo (Ver por ejemplo, Joliet y otros,

1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

5 Para anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es, típicamente, 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, con mayor preferencia, 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 de la invención pueden reducirse además mejorando la captación y penetración en el tejido (*por ejemplo*, en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

10 El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de anticuerpos de la invención 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 entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, con mayor preferencia entre aproximadamente 3 a 7 semanas e incluso con mayor preferencia durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras modalidades, 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 por año. Se apreciará además que la dosificación eficaz de los anticuerpos usados para el tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento en particular.

6.4.1 Composiciones farmacéuticas

25 Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ejemplo*, 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. Estas composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en la presente invención o una combinación de los agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de anticuerpos de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En una modalidad en particular, la composición farmacéutica consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o un fragmento de este de la invención, un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno de cáncer y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, dicha composición farmacéutica comprende además uno o más agentes anticancerígenos.

40 En otra modalidad en particular, la composición farmacéutica comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o fragmento de este de la invención que une específicamente el dominio extracelular de FcγRIIB humano y bloquea el sitio de unión de Fc de FcγRIIB humano; (ii) un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno de cáncer; y (iii) un portador farmacéuticamente aceptable.

45 En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa, aprobado para su uso en animales, y más particularmente para el uso en humanos, por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas generalmente reconocidas. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Estos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas se pueden emplear también como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

60 Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se proporcionan separadamente, o mezclados conjuntamente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado como una ampollita o bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se administra por infusión, ésta se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampollita de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse 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 hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Existe descrito además en la presente invención composiciones farmacéuticas y kits que comprenden un antagonista FcγRIIB para usar en la prevención, tratamiento, manejo, o mejoría de un tumor maligno de células B, o uno o más síntomas de este. Particularmente, las composiciones farmacéuticas y kits comprenden un anticuerpo FcγRIIB humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este.

6.4.2 Kits

Existe descrito en la presente invención un envase o estuche farmacéutico que comprende uno o más contenedores llenos con los anticuerpos humanizados de la invención. Además, pueden incluirse también en el envase o estuche farmacéutico uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. La invención proporciona, además, un paquete o estuche del producto farmacéutico o veterinario que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, puede haber un aviso asociado con tal(es) contenedor(es) en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de los productos farmacéutico o biológicos, donde el aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana.

La presente descripción proporciona kits que pueden usarse en los métodos descritos. En un ejemplo, un estuche comprende uno o más anticuerpos humanizados de la invención. En otro ejemplo, el estuche comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más contenedores. En otra modalidad, un estuche comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que unen uno o más antígenos cancerosos asociados con el cáncer. En algunos ejemplos, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otros ejemplos, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

6.5 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas o agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se prueban, preferentemente *in vitro*, por ejemplo, en un sistema de cultivo celular, y después *in vivo*, por ejemplo, en un organismo modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para evaluar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en los humanos. Por ejemplo, se indica los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica, incluidos los ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido de un paciente se crece en cultivo y se expone a o de cualquier otra forma se pone en contacto con una composición farmacéutica y se observa el efecto de esta composición sobre la muestra de tejido, por ejemplo, la inhibición de o disminución en el crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de red tubular en la preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular. La muestra de tejido puede obtenerse mediante la biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profilácticamente o terapéuticamente más eficaz(es) para cada paciente individual. Alternativamente, en lugar de cultivar células de un paciente, pueden tamizarse los métodos y agentes terapéuticos usando células de una línea celular tumoral o maligna. En diversas modalidades específicas, ensayos *in vitro* pueden llevarse a cabo con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado en estos tipos de células. Muchos ensayos estándar en la técnica pueden usarse para evaluar esta supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul tripán, 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 la preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular, etc. Ensayos adicionales incluyen asociación con raft, ensayos de CDC, ADCC y apoptosis como los conocidos en la técnica.

Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en humanos. Estos sistemas de modelos animales incluyen, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En una modalidad específica de la invención, se prueban combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo en ratón. Estos sistemas de modelo se usan ampliamente y se conocen bien por el técnico con experiencia. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar, tales como el régimen temporal para administrar los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si estos agentes se administran por separado o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos para usar en la presente invención son, ratones transgénicos que expresan FcγR en

las células efectoras de ratón, *por ejemplo*, cualquier modelo de ratón descrito en, la patente de Estados Unidos núm. 5,877,396. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, ratones portadores de FcγRIIIA humano, ratones portadores de FcγRIIA humano, ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano, ratones portadores de FcγRIIB y FcγRIIA humano.

5 Una vez que se han probado los agentes profilácticos y/o terapéuticos descritos en la presente invención 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 de la invención, pueden establecerse usando la experimentación de rutina.

10 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en la presente invención 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 otros(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Los modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias pueden usarse también para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención. A continuación se proporcionan algunos ensayos como ejemplos, y no a modo de limitación.

15 Los principales modelos animales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de artritis inducida por adyuvantes en rata, modelos de de artritis inducida por colágeno en ratón y rata y modelos de de artritis inducida por antígeno en rata, conejo y hámster, todos 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 otros(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

20 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación descritas en la presente invención puede evaluarse usando un modelo de artritis inducida por carragenina en rata. La artritis inducida por carragenina se ha usado además en conejo, perro y cerdo en estudios de inflamación o artritis crónica. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se usa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar un modelo de artritis inducida por carragenina de este tipo se describen en Hansra P. y otros, "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat," *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). Comúnmente se usan además modelos animales de inflamación inducida por cimosano, como se conoce y se describe en la técnica. Una artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal para la enfermedad autoinmunitaria humana de artritis reumatoide (RA) (Trenthorn y otros, 1977, *J. Exp. Med* 146:857, esta enfermedad puede inducirse en muchas especies por la administración del colágeno heterólogo tipo II (Courtenay y otros, 1980, *Nature* 283:665; y Cathcart y otros, 1986, *Lab. Invest.* 54:26); con respecto a los modelos de artritis animales ver, además, por ejemplo, Holmdahl, R., 1999, *Curr. Biol.* 15:R528-530

25 La actividad antiinflamatoria de terapias de combinación discutidas en la presente invención puede evaluarse además midiendo la inhibición del edema en la pata inducido por carragenina en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C. A, y otros, "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se usó como un primer tamizaje *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los NSAID y se considera predictivo de la eficacia en humano. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos probados se expresa como el porcentaje de inhibición del incremento del peso de la pata trasera del grupo prueba en relación con el grupo de control dosificado con el portador.

30 Además, los modelos animales para enfermedad inflamatoria del intestino se pueden usar además para evaluar la eficacia de las terapias de combinación discutidas en la presente invención (Kim y otros, 1992, *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(Supl. 12):3S-10S La colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino que pueden inducirse en los animales. 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 trinitrobencenosulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a los animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

35 Los modelos animales para el asma pueden usarse además para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Un ejemplo de un modelo de ese tipo es el modelo murino de transferencia adoptiva en el que la provocación por aeroalérgenos de los ratones receptores TH1 y TH2 resulta en la migración de células efectoras de TH a las vías respiratorias y se asocia con una respuesta inflamatoria intensa neutrofílica (TH1) y eosinofílica (TH2) de la mucosa pulmonar (Cohn y otros, 1997, *J. Exp. Med* 186:1737-1747.

40 Los modelos animales para trastornos autoinmunitarios pueden usarse también para evaluar la eficacia de las terapias de combinación de la invención. Se desarrollaron modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders y otros, 1999, *Autoimmunity* 29:235-246; Krogh y otros, 1999, *Biochimie* 81:511-515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19:12-24).

45 Más aun, pueden usarse cualquiera de los ensayos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica para evaluar la

utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la presente invención para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

5 La toxicidad y eficacia terapéutica de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, *por ejemplo*, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal del 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz para el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tomar la precaución de diseñar un sistema de entrega que dirija estos agentes al sitio del tejido afectado, para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

15 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 humanos. La dosificación de estos agentes se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ 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 método de la invención, 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 IC₅₀ (es *decir*, la concentración de compuesto prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según determinada en cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

25 La actividad anticancerígena de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención 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 desnudos 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, eds. Fiebig y Burger); *Contributions to Oncology* (1999, Karger); *The Nude Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher).

35 Los protocolos y composiciones de la invención se prueban, preferentemente *in vitro*, y después *in vivo*, para la actividad profiláctica o terapéutica deseada, antes de su uso en humanos. Los agentes terapéuticos y métodos pueden tamizarse usando células de una línea celular tumoral o maligna. Muchos ensayos estándar en la técnica pueden usarse para evaluar esta supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (*por ejemplo*, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul tripán, 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 la preparación de membrana basal tridimensional o matriz extracelular, *etc.*

45 Los compuestos para su uso en la terapia pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de probarlos en 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.

Más aun, puede usarse cualquier ensayo conocido por aquellos con experiencia en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la invención para el tratamiento o prevención del cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmunitaria.

50 6.6 Métodos de diagnóstico

Los anticuerpos marcados de la invención pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorear enfermedades, trastornos o infecciones. La descripción permite la detección o diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección, particularmente de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende: 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, *por ejemplo*, niveles en muestras de tejido normal, mediante el cual un aumento en el nivel ensayado de antígeno en comparación con el nivel control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección.

60 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para ensayar los niveles de FcγRIIB en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos, como se describe en la presente invención o como se conoce por los expertos en la técnica (*por ejemplo*, ver Jalkanen y otros, 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen y otros, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096. Otros métodos 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 adecuados para ensayo de anticuerpos se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{33}S), tritio (^3H), indio (^{121}In), y tecnecio (^{99m}Tc); marcadores luminiscentes, tal como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

5 Existe descrito en la presente invención la detección y diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección en un humano. El diagnóstico puede comprender: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado que se une inmuno específicamente a Fc γ RIIB; b) dejar pasar un intervalo de tiempo seguido a la administración para permitir al anticuerpo marcado que se concentre preferentemente en sitios donde se expresa Fc γ RIIB en el sujeto (y para que la molécula marcada no unida se depure hasta el nivel de base); c) determinar el nivel de base; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, tal que la detección del anticuerpo marcado por encima del nivel de base indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno o infección. El anticuerpo puede marcarse con una porción de imageneología, que es detectable usando un sistema de imágenes conocido por el experto en la técnica. El nivel de base puede determinarse mediante diversos métodos incluyendo, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor determinado previamente por un sistema en particular.

20 Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de imageneología usado determinarán la cantidad de la porción de imágenes necesaria para producir las imágenes de diagnóstico. En el caso de una porción de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada varía normalmente en el intervalo de aproximadamente 5 hasta 20 milicurios ^{99m}Tc . Después el anticuerpo marcado se acumulará preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. *In vivo* la imageneología del tumor se describe en S.W. Burchiel y otros, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

25 Dependiendo de diversas variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo seguido a la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en los sitios del sujeto y para que la molécula marcada no unida se depure 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 modalidad, el intervalo de tiempo seguido a la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

35 En una modalidad, se lleva a cabo el monitoreo de una enfermedad, trastorno o infección 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.

40 La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para el tamizaje *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos serán capaces de determinar el método adecuado para detectar un marcador en particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero sin limitarse a, tomografía computerizada (CT), escáner de cuerpo entero tal como tomografía por emisión de positrones (PET), imageneología por resonancia magnética (MRI) y sonografía

45 En una modalidad 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 otros, la patente de Estados Unidos núm. 5,441,050). En otra modalidad, 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 modalidad, la molécula se marca con un metal que emiten positrón y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En aun otra modalidad, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando imageneología por resonancia magnética (MRI).

50 7. Ejemplos

7.1 Humanización del anti-CD32b de ratón, mAb 2b6

55 ARN se convirtió a ADNc y los segmentos VL y VH se amplificaron por PCR usando el estuche de RLM-RACE (Ambion, Inc.). Los cebadores específicos al gen para la VH fueron SJ15R, sec. con núm. de ident. 47 (5' GGT CAC TGT CAC TGG CTC AGG G 3') y SJ16R, sec. con núm. de ident. 48 (5' AGG CGG ATC CAG GGG CCA GTG GAT AGA C 3'). Los cebadores específicos al gen para la VL fueron SJ17R, sec. con núm. de ident. 49 (5'GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TG 3') y SJ18R, sec. con núm. de ident. 50 (5' CGG CGG ATC CGA TGG ATA CAG TTG GTG CAG CAT C 3'). El producto de RACE se insertó en el plásmido pCR2.1-TOPO usando un estuche de clonación TOPO TA (Invitrogen, Inc.). Los plásmidos resultantes se sometieron después a la secuenciación del ADN para determinar las secuencias de VH y VL de 2B6. Las secuencias resultantes se tradujeron después y se determinó la secuencia de aminoácidos prevista para cada una. A partir de estas secuencias, el marco de lectura (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) se identificaron como se definió por Kabat. La VH de ratón se unió después a la región constante C-gamma humana y una secuencia líder de Ig y se insertó dentro de pCI-neo para la expresión en mamíferos.

La VL de ratón se unió a un segmento C-kappa humano y una secuencia líder de Ig y se clonó también dentro de pCI-neo para la expresión en mamífero.

5 El VH 2B6 humanizado se compone de los segmentos FR a partir del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 y JH6, y las regiones CDR de VH 2B6. El VL 2B6 humanizado se compone de los segmentos de FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 y JK4, y las regiones CDR de VL 2B6. Los segmentos VH y VL humanizados se ensamblaron de nuevo a partir de oligonucleótidos combinados y amplificados por PCR. El fragmento resultante se combinó después por PCR con una secuencia líder y el segmento adecuado de región constante se clonó dentro del vector de expresión pCI-neo como un fragmento Nhe I - EcoR I. La secuencia de ADN de los plásmidos resultantes se confirmó mediante análisis de secuencia. Para el VL, ningunos de los plásmidos analizados tuvo una secuencia perfectamente correcta. Los dos mejores inserciones se combinaron para reducir el número de posiciones incorrectas, después estas posiciones se corrigieron mediante mutagénesis de sitio dirigido. Después de este procedimiento se identificaron los segmentos de la cadena ligera con la secuencia 2B6 VL humanizada prevista.

15 La alineación de las secuencias de aminoácidos de 2B6 VH de ratón, 2B6 VH1 humanizado, VH1-18 y JH6 humano se muestra en la Figura 1A. La Figura 1B muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de 2B6VL murino, 2B6VL-1 humano, 2B6VL-2 humano; 2B6VL-3 humano, y Jk4 humano. El primer aminoácido en el 2B6VL CDR2 humanizado se encontró que era asparagina (ver, *por ejemplo*, aminoácido número 1 de la sec. con núm. de ident.:9), que permite presumiblemente la glicosilación enlazada a N y afecta posiblemente a la unión del anticuerpo. Por esta razón el aminoácido número 1 del dominio variable de la cadena ligera CDR2 se substituyó con tirosina (h2B6 VL-2, h2B6 VL-3) o ácido glutámico (h2B6 VL-5; aminoácido 50 de la sec. con núm. de ident.:62) para eliminar el sitio de glicosilación (Figura 2B). h2B6 VL-5 (sec. con núm. de ident.:62) además contiene una substitución con fenilalanina en el aminoácido número 21 de la región 1 del marco de lectura (aminoácido número 21 de la sec. con núm. de ident.:62), que se corresponde con el aminoácido en la misma posición del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo donador.

20 La Figura 2A muestra la alineación de las regiones variables de la cadena pesada, h2B6 VH-1 y h2B6 VH-3 (sec. con núm. de ident.:68). h2B6 VH-3 contiene una substitución en el aminoácido número 13 de la región 2 del marco de lectura (aminoácido número 48 de la sec. con núm. de ident.:68), y substituciones con valina en el aminoácido número 6 de la región 3 del marco de lectura (aminoácido 72 de la sec. con núm. de ident.:68), que corresponde con el aminoácido en la misma posición del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo donador.

30 7.2 Expresión y caracterización de las cadenas pesada y ligera de 2B6 humanizado.

35 *Experimento 1:* El plásmido de expresión de la cadena pesada (HC) de hu2B6 se co-transfectó junto con la cadena ligera (LC) de ch2B6 en las células HEK-293. Al mismo tiempo, el ch2B6HC se co-transfectó con el ch2B6LC. Después de tres días en cultivo la cantidad de IgG humana expresada se cuantificó por ELISA. La unión de FcγRIIb-Fc dimérico soluble se determinó después por el ensayo de ELISA.

40 *Protocolo para el ensayo de ELISA:* 2.5 ng/pocillo de FcγRIIb-Fc soluble se capturó en placas de 96-pocillos Maxisorp por el anticuerpo 3H7 anti-FcγRIIb a temperatura ambiente durante 1 hora. Una dilución seriada doble de medio condicionado de ch2B6, h2B6Hc/Ch2B6Lc, h2B6 v1.1 (que comprende el dominio variable de la cadena pesada de h2B6 VH-1 (Figura 1A y Figura 2A) y el dominio variable de la cadena ligera de h2B6 VL-1 (Figura 1-B y Figura 2B)) o h2B6 v3.5 (que comprende el dominio variable de la cadena pesada de h2B6 VH-3 (Figura 2A; sec. con núm. de ident.:68) y dominio variable de la cadena ligera h2B6 VL-5 (Figura 2B; sec. con núm. de ident.:62)) iniciando desde 25ng/pocillo se añadió a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, después la unión se detectó por F(ab)₂ conjugado con HRP del anticuerpo secundario específico de anti F(ab)₂ de IgG humana en carnero. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante aproximadamente 45 minutos, la placa se desarrolló usando un sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con H₂SO₄ al 1%. La DO₄₅₀ nm se leyó con el programa SOFTmax. Entre cada etapa, las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween20 al 0.1%. Las placas se bloquearon con BSA al 0.5% en PBS/Tween 20 al 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir el FcγRIIb-Fc soluble.

55 *Resultados:* Los resultados del ensayo de ELISA con hu2B6HC/ch2B6LC y ch2B6 (ch2B6HC/ch2B6LC) se describen en la Figura 3, los cuales indican que el mAb hu2B6HC/ch2B6LC se unió al receptor con la misma afinidad que el mAb ch2B6HC/ch2B6LC. Un segundo ELISA se realizó como descrito para ch2B6, h2B6 1.1, y h2B6 3.5 con la excepción de que el FcγRIIb-Fc soluble se capturó directamente en las placas de 96-pocillos Maxisorp a 4 °C durante toda la noche (Figura 4). Los resultados indican que h2B6 3.5 se une al receptor con la misma afinidad que ch2B6, y sustancialmente mayor afinidad que ch2B6 1.1, el cual comprende el sitio de glicosilación en el CDR del dominio variable de la cadena ligera.

60 El análisis por FACS se realizó después para medir la unión de los mAb a las células Daudi.

65 *Protocolo para el análisis por FACS.* Aproximadamente 10⁶ células Daudi se usaron para cada tinción de anticuerpo. Las células se lavaron una vez con PBS. Anticuerpos primarios (Ch2B6, Hu2B6Hc/ch2B6Lc, IgG 1 humana) se diluyeron en 0.5, 0.1, 0.02 µg/ml de PBS/BSA al 1% y 100 µl de anticuerpos diluidos se transfirió a las células. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, las células se lavaron una vez con 1 ml PBS/BSA al 1%. PE conjugado con el

fragmento F(ab')₂ de anti Fc específica de IgG humana en carnero (Jackson ImmunoResearch, Inc.) se usó como anticuerpo secundario en la dilución 1:1000. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron una vez con 1 ml PBS/BSA al 1%. Las células se resuspendieron después en 500 µl of PBS/BSA al 1% y sometieron a análisis por FACS.

5

Resultados: Los resultados indican que mAb hu2B6HC/ch2B6LC se une a esta línea tumoral de células B humanas con similar afinidad que el mAb quimérico (Tabla 6).

Tabla 6 :

Anticuerpo primario	Concentración (µg/ml)	Fluorescencia promedio
IgG1 Humano	0.5	9.49
	0.1	N/A
	0.02	N/A
Ch2B6	0.5	647.48
	0.1	511.85
	0.02	172.68
Hu2B6Hc/Ch2B6Lc	0.5	648.99
	0.1	546.46
	0.02	196.93

10

Experimento 2: Transfecciones de células HEK-293 se realizaron usándolas siguientes combinaciones: hu2B6HC/hu2B6LC, hu2B6HC/ch2B6LC, ch2B6HC/hu2B6LC y ch2B6HC/ch2B6LC. Después de tres días en cultivo, la cantidad de IgG humana expresada se cuantificó por ELISA usando el protocolo descrito anteriormente. La unión de FcγRIIb-Fc dimérico soluble se determinó después por ELISA. Los resultados de este experimento, descritos en la Figura 5, indicaron que todos los mAb se unen al receptor con la misma afinidad. El análisis por FACS se realizó después usando el protocolo descrito anteriormente para medir la unión de los mAb a las células Daudi (Tabla 7). Los resultados indican que el mAb hu2B6HC/hu2B6LC se une a esta línea tumoral de células B humanas con la misma afinidad que el mAb ch2B6.

15

20

Tabla 7

Anticuerpo primario	Concentración (ng/ml)	Fluorescencia promedio
IgG1 Humano	0.5	6.07
	0.1	N/A
	0.02	N/A
Ch2B6	0.5	551.52
	0.1	514.69
	0.02	168.17
Hu2B6	0.5	628.82
	0.1	618.13
	0.02	228.74

25

30

35

40

7.3 Generación, expresión y unión de variantes de hu2b6lc.

Hay una secuencia consenso del sitio N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) en la región CDR2 de Hu2B6LC (Asn₅₀-Val-Ser). Para eliminar la glicosilación en el residuo 50 y limitar así la variación potencial en la producción así como el potencial de inmunogenicidad de una aplicación farmacéutica, otros aminoácidos se sustituyeron en la posición 50 usando la mutagénesis de sitio dirigido (estuche Stratagene). Dos versiones diferentes de Hu2B6LC se generaron, Hu2B6LC-N50Y Hu2B6LC-N50Y,V51A. Estos aminoácidos se seleccionaron debido a que tirosina es el residuo aceptor humano en la posición 50 de CDRL2 y alanina es el residuo en la posición 51 de CDRL2 en el segmento génico de la línea germinal humana.

45

5 Transfecciones de células HEK-293 se realizaron usando las siguientes combinaciones: hu2B6HC/hu2B6LC; hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y); hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y,V51A); ch2B6HC/ch2B6LC. Después de tres días en cultivo la cantidad de IgG humana expresada se cuantificó mediante un ensayo de ELISA, usando el método descrito anteriormente. La unión de FcγRIIb-Fc dimérico soluble se determinó mediante el ensayo de ELISA. Los resultados de este experimento, descritos en la Figura 6, indicaron que todos los mAb se unen al receptor con la misma afinidad. El análisis por FACS se realizó después para medir la unión de los mAb a las células Daudi (Tabla 8). Los resultados demuestran que las dos variantes de mAb hu2B6LC/hu2B6HC se une a esta línea tumoral de células B humanas con la misma afinidad que el mAb ch2B6.

10

Tabla 8

	Anticuerpo primario	Concentración (µg/ml)	Fluorescencia promedio
15	IgG1 Humano	0.5	1.23
		0.1	N/A
		0.02	N/A
20	Ch2B6	0.5	192.88
		0.1	141.01
		0.02	45.59
25	Hu2B6	0.5	201.69
		0.1	174.37
		0.02	58.65
30	Hu2B6 N50Y	0.5	191.16
		0.1	134.56
		0.02	40.14
35	Hu2B6N50Y,V51A	0.5	167.16
		0.1	133.83
		0.02	45.95

40 7.4 Unión de los mab a FcRIIA

45 *Protocolo para el ensayo de ELISA:* 100 ng/pocillo de FcγIIA soluble en tampón carbonato se recubrió en las placas de 96-pocillos Maxisorp a 4°C durante toda la noche. Una dilución seriada doble de medio condicionado de Ch2B6; hu2B6HC/hu2B6LC; hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y); hu2B6HC/hu2B6LC(N50Y,V51A); y IV.3 purificado iniciando a partir de 25ng/pocillo se añadió a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La unión se detectó con el anticuerpo secundario específico a F(ab')₂ de anti-F(ab')₂ de IgG humana en camero conjugado a HRP para Ch2B6 y todas las muestras de hu2B6 y anticuerpo secundario anti F(ab')₂ de IgG (H+L) de ratón en camero conjugado a HRP para IV.3. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante aproximadamente 45 minutos, la placa se desarrolló usando un sustrato de TMB. Después de 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con H₂SO₄ al 1%. La DO₄₅₀ nm se leyó con el programa SOFTmax. Entre cada etapa, las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween 20 al 0.1%. Las placas se bloquearon con BSA al 0.5% en PBS/ Tween 20 al 0.1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir los anticuerpos diluidos en serie.

55 *Resultados:* Estos datos muestran que el anticuerpo 2B6 humanizado no perdió su capacidad de unir selectivamente a CD32B durante el proceso de humanización (Figura 7). En resumen IV.3 (un MAb murino contra FcγIIA) se une a FcγIIA mientras que el 2B6 quimérico y humanizado no lo hace.

7.5 Control del crecimiento tumoral mediado por Fc en un modelo tumoral in vivo

60 Las mutaciones Fc anteriormente identificadas que confieren afinidad mejorada para FcγIIIA y/o FcγIIA a los anticuerpos FcγRIIB se analizaron además para su eficacia relativa del control tumoral usando un sistema de modelo tumoral *in vivo* (ver, solicitud provisional de Estados Unidos 60/707,419 presentada el 10 de Agosto de 2005).

Materiales y Métodos

5 Los anticuerpos que albergan los mutantes Fc se probaron para la actividad antitumoral en un sistema de xenoinjerto murino. Ratones Balb/C desnudos se inyectaron por vía subcutánea con 5×10^6 células Daudi y seguidamente se controlaron para los signos generales de la enfermedad, por ejemplo, aumento/pérdida de peso y actividad de acicalamiento. Sin tratamiento, este sistema modelo resulta en 100% de mortalidad con un promedio de tiempo de supervivencia de aproximadamente 2 semanas posterior a la inoculación de la célula tumoral. El tratamiento consiste en la dosis de anticuerpo silvestre o anticuerpo que comprende una variante de la región Fc administrada a intervalos semanales. Los animales administrados solo con tampón en los mismos intervalos sirvieron como control. El peso del tumor se calculó basado en el volumen estimado del tumor subcutáneo de acuerdo con la fórmula $(\text{ancho}^2 \times \text{longitud})/2$.

Resultados

15 A intervalos semanales, los ratones inoculados con células Daudi recibieron 2B6 silvestre humanizado ("h2B6"), 2B6 humanizado que comprende una región Fc que tiene 243L, 292P, 300L, **305I**, y 396L o sólo tampón. El anticuerpo h2B6 silvestre y mutante de Fc mostró niveles similares de supresión tumoral en el esquema de dosis más alta probada, dosis semanales de 25 μg (Figuras 7 A y B). Sin embargo, diferencias significativas en la eficacia del anticuerpo se observaron cuando las dosis se redujeron. La reducción de 100 y 10 veces en la dosificaciones de h2B6 silvestre no proporcionó ningún control del tumor mayor que la administración del tampón solo (FIG. 8A). A diferencia, el h2B6 mutante de Fc proporcionó protección significativa en dosis semanales de 2.5 μg y al menos una protección limitada en dosis semanales de 0.25 μg (Figura 8B).

20 La protección conferida por incluso la dosis más baja de anticuerpo mutante de Fc se confirmó en las comparaciones de supervivencia. A las 11 semanas, 4 de cada 7 ratones permanecieron vivos en el grupo tratado con dosis de 0.25 μg de h2B6 mutante de Fc en comparación con sólo 1 de cada 7 en el grupo tratado con la misma dosis de h2B6 silvestre (Figuras 9A y 9B).

25 Diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en la presente, serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos acompañantes. Se pretende que tales modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones anexadas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humanizado que comprende una región Fc humana y un dominio variable, en donde dicho anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano a través de dicho dominio variable, en donde dicho dominio variable comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:68 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:62, o un fragmento de dicho anticuerpo que comprende dicho dominio variable y se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano a través de dicho dominio variable.
- 10 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde el dominio Fc comprende al menos una modificación de aminoácidos en el dominio de Fc.
- 15 3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, en donde al menos dicha una modificación de aminoácidos comprende una sustitución en la posición 243, una sustitución en la posición 292, una sustitución en la posición 300, una sustitución en la posición 305, y una sustitución en la posición 396 y en donde dichas posiciones están de acuerdo con Kabat.
- 20 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 3, en donde la sustitución en la posición 243 es una sustitución con leucina, la sustitución en la posición 292 es una sustitución con prolina, la sustitución en la posición 300 es una sustitución con leucina, la sustitución en la posición 305 es una sustitución con isoleucina, y la sustitución en la posición 396 es una sustitución con leucina y en donde dichas posiciones están de acuerdo con Kabat.
- 25 5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este es un fragmento F(ab')₂ o un fragmento F(ab).
- 30 6. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 35 7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo está operativamente enlazado a un polipéptido heterólogo.
8. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo está conjugado a un agente terapéutico.
- 40 9. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 8, en donde dicho agente terapéutico es una citotoxina.
- 45 10. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio variable de la cadena pesada o dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 1.
- 50 11. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en donde dicho medicamento es para el uso en conjunto con un anticuerpo secundario que se une específicamente a un antígeno de cáncer y es citotóxico y en donde dicho cáncer está **caracterizado por** dicho antígeno de cáncer.
- 55 12. Una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1; (ii) un anticuerpo citotóxico que une específicamente un antígeno de cáncer; y (iii) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en el tratamiento del cáncer.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición de acuerdo con la reivindicación 12 o composición para uso de acuerdo con la 13, en donde dicho antígeno de cáncer es el antígeno pancarcinoma KS ¼, antígeno del carcinoma ovárico (CA125), fosfato de ácido prostático, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), TAG-72, GICA 19-9, CTA-1, LEA, antígeno 38.13 de linfoma de Burkitt, CD19, CD20, CD33, GD2, GD3, GM2, GM3, un antígeno de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA), L6 humano, L20 humano, EGFR, o HER2/neu.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, o la composición de acuerdo con la reivindicación 12 o composición para el uso de acuerdo con la 13, en donde dicho antígeno de cáncer es un antígeno de carcinoma de mama, ovario, próstata, cervical, o pancreático.

16. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario.
- 5 17. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno alérgico mediado por IgE, en donde dicho trastorno es asma, rinitis alérgica, una alergia gastrointestinal, eosinofilia, conjuntivitis, dermatitis atópica, urticaria, anafilaxis, o nefritis glomerular.
- 10 18. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 para usar en
 (i) el tratamiento de un trastorno autoinmunitario;
 (ii) el tratamiento o prevención de un trastorno alérgico mediado por IgE, en donde dicho trastorno es asma, rinitis alérgica, una alergia gastrointestinal, eosinofilia, conjuntivitis, dermatitis atópica, urticaria, anafilaxis, o nefritis glomerular;
- 15 19. Un método para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitario en un sujeto que comprende:
 (a) contactar una muestra biológica de dicho sujeto con una cantidad eficaz del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, y
 20 (b) detectar la unión de dicho anticuerpo,
 en donde dicha detección por encima de un nivel de base o estándar indica que dicho sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria.
- 25 20. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para mejorar la presentación de antígeno o procesamiento de antígeno de un antígeno, de ese modo mejorar una respuesta inmune a la composición vacunal en un sujeto.
- 30 21. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y la reducción en la población de células cancerosas que expresan FcγRIIB en un paciente, en donde dicho cáncer está **caracterizado por** un antígeno de cáncer.
- 35 22. El uso del anticuerpo humanizado de la reivindicación 21 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y la eliminación de las células cancerosas que expresan FcγRIIB en un paciente, en el que dicho cáncer está **caracterizado por** un antígeno de cáncer, que es el antígeno pancarcinoma KS ¼, antígeno del carcinoma ovárico (CA125), fosfato de ácido prostático, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a melanoma p97, antígeno de melanoma gp75, antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), antígeno de membrana específico de próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA), TAG-72, GICA 19-9, CTA-1, LEA, antígeno 38.13 de linfoma de Burkitt, CD19, CD20, CD33, GD2, GD3, GM2, GM3, un
 40 antígeno de superficie celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA), L6, L20, EGFR, o HER2/neu.

	0		3	3
	1		1	6
Mu2B6VH	QVQLQQPVTELVKPGASVMLSCKASDYPFT		NYWVH	WVKQRPQGLEWIG
Hu2B6VH-1	---V-SGA-VKK-----KV-----G-T--		---	---R-A-----M-
VH1-18	---V-SGA-VKK-----KV-----G-T--		S-G-S	---R-A-----M-
		FR1	CDR1	FR2
	5		6	
	0		6	
Mu2B6VH	VIDPSDTPYNYNKKFKG	KATLTVVSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCAR		
Hu2B6VH-1	-----T-----	RV-M-TDT-T-----E-R--R---T-----		
VH1-18	W-SAYNGNT--AQ-LQ-	RV-M-TDT-T-----E-R--R---T-----		
		CDR2	FR3	
		1		
	9		0	
	5		3	
Mu2B6VH	NGDSDYYSGMDY	WGQGTSVTVSS		
Hu2B6VH-1	-----T-----			
HuJH6	--Y--V	-----T-----		
		CDR3	FR4	

FIG. 1A

	0		2		3
	1		4		5
Mu2B6VL	DILLTQSPAILSVPGERVGFSC	RTSQSIGTNIH	WYQQRINGFRLLIK		
Hu2B6VL-1	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
Hu2B6VL-2	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
Hu2B6VL-3	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-----	-----KPDQS-K----		
VK-A26	E-V-----DFQ--T-K-K-TIT-	-A-----SSL-	-----KPDQS-K----		
		FR1	CDR1	FR2	
	5		5		
	0		7		
Mu2B6VL	NVSESI	GIPSRFSGSGGTDFILSINSVESEDIADYYC			
Hu2B6VL-1	-----V-----T-T---L-A--A-T---				
Hu2B6VL-2	Y-----V-----T-T---L-A--A-T---				
Hu2B6VL-3	YA-----V-----T-T---L-A--A-T---				
VK-A26	YA-Q-F- -V-----T-T---L-A--A-T---				
		CDR2	FR3		
	8		9		
	9		8		
Mu2B6VL	QQSNTWPFT	FGGGTKLEIK			
Hu2B6VL-1	-----V---				
Hu2B6VL-2	-----V---				
Hu2B6VL-3	-----V---				
VK-A26	H-SSL-				
HuJK4		L- -----V---			
		CDR3	FR4		

FIG. 1B

	1	10	20	30	40	50																																																				
h2B6VH-1	Q	V	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	W	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	V	I	D	P	S	D	T	Y	P	N
h2B6VH-3	Q	V	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	W	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	V	I	D	P	S	D	T	Y	P	N
	60	70	80	90	100	110																																																				
	<u>Y</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u>																																																									
	<u>Y</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u>																																																									
	120																																																									
	VSS																																																									
	VSS																																																									

FIG. 2A

	1	10	20	30	40	50																																																					
H2B6VL-1	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	F	Q	S	V	T	P	K	E	K	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	I	G	T	N	I	H	W	Y	Q	Q	K	P	D	Q	S	P	K	L	L	I	K	N	V	S	E	S	I	S	G	V	P
H2B6VL-2	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	F	Q	S	V	T	P	K	E	K	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	I	G	T	N	I	H	W	Y	Q	Q	K	P	D	Q	S	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	V	P
H2B6VL-3	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	F	Q	S	V	T	P	K	E	K	V	T	I	T	C	R	T	S	Q	S	I	G	T	N	I	H	W	Y	Q	Q	K	P	D	Q	S	P	K	L	L	I	K	Y	V	S	E	S	I	S	G	V	P
H2B6VL-5	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	F	Q	S	V	T	P	K	E	K	V	T	F	T	C	R	T	S	Q	S	I	G	T	N	I	H	W	Y	Q	Q	K	P	D	Q	S	P	K	L	L	I	K	E	V	S	E	S	I	S	G	V	P
	60	70	80	90	100	107																																																					
	<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u>																																																										
	<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u>																																																										
	<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u>																																																										
	<u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u>																																																										

FIG. 2B

Unión del hu2B6HC/ch2B6LC mAb y ch2B6 mAb a FcγRIIB

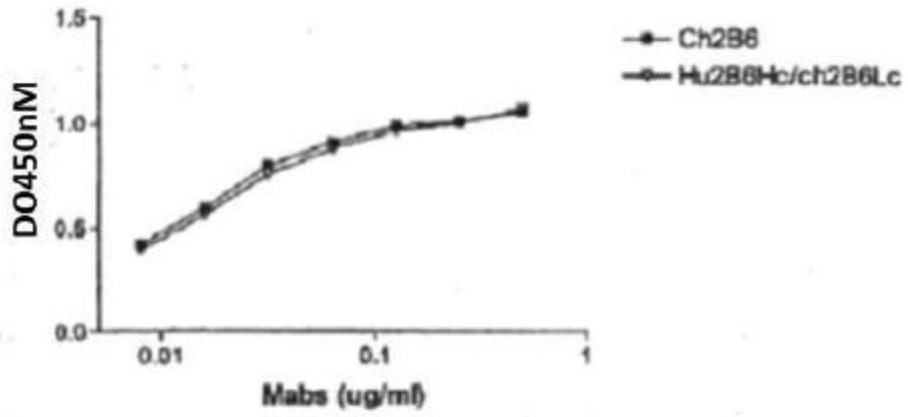


Figura 3

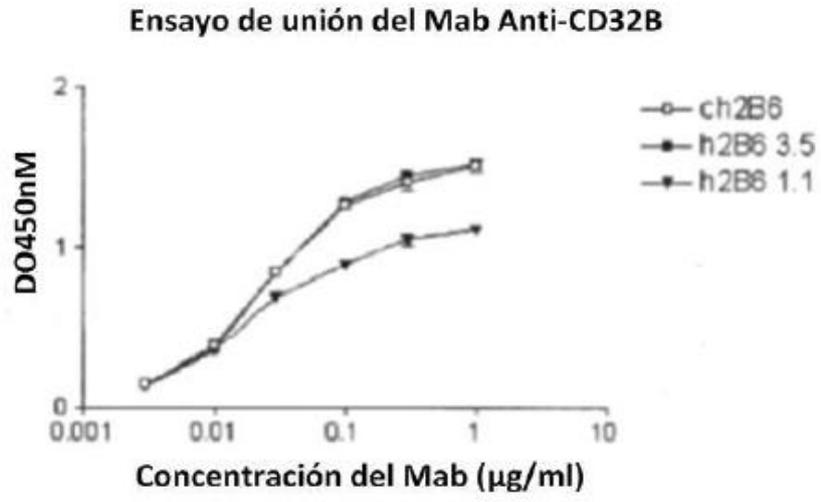


Figura 4

Unión del hu2B6LC/ch2B6HC mAB, ch2B6LC/ch2B6HC y ch2B6 mAB a FcγRIIB

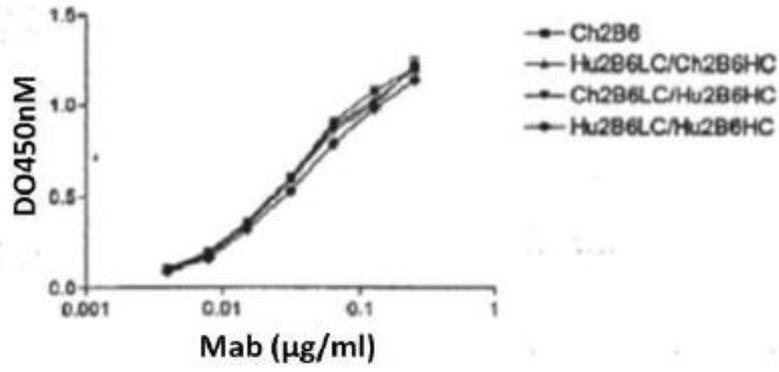


Figura 5

Unión de variantes de hu2B6 a FcγRIIB

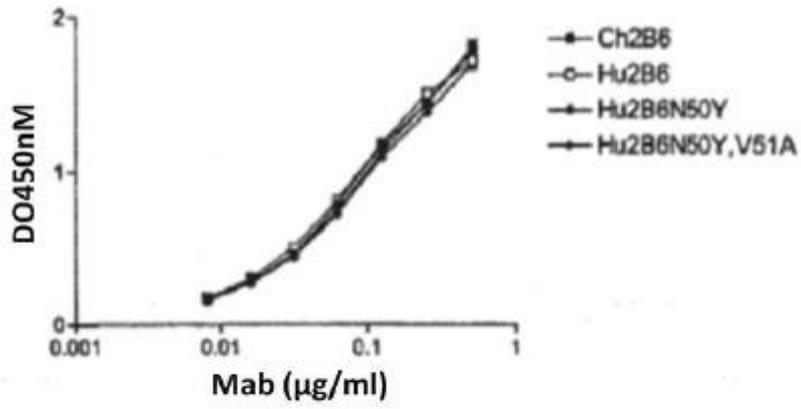


Figura 6

Unión de variantes de hu2B6 a FcγRIIA

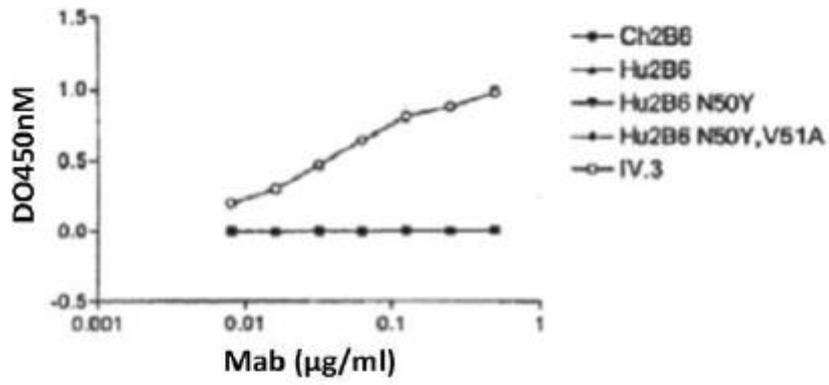


Figura 7

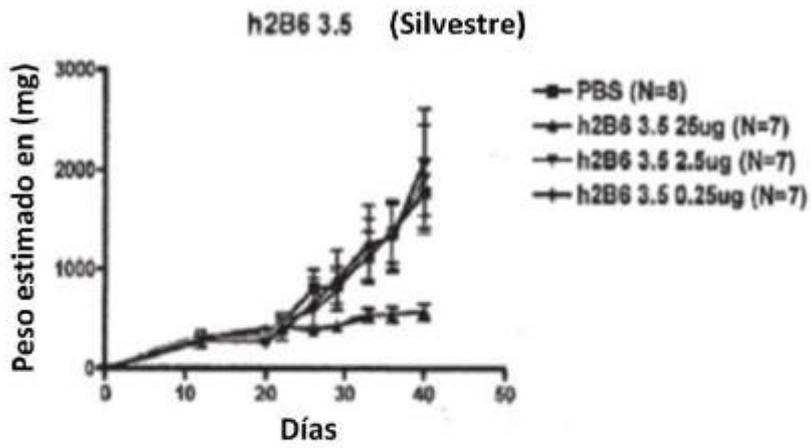


Figura 8A

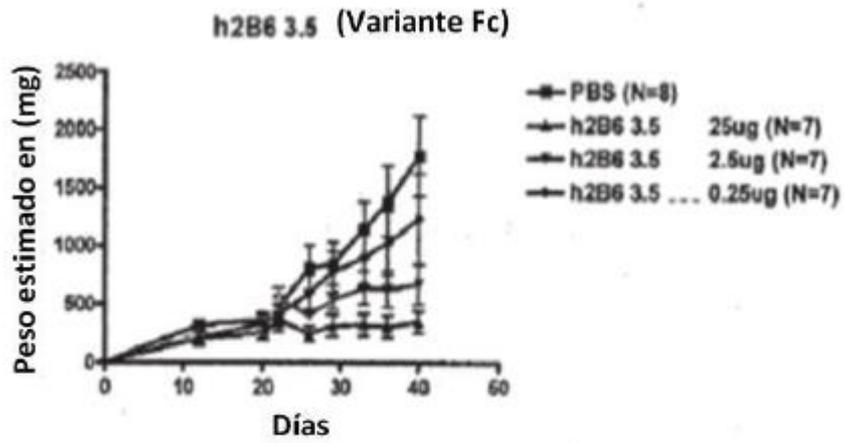


Figura 8B

Proporciones de sobrevivientes libres de tumor de h2B6 3.5: Sobrevivientes (Silvestre)

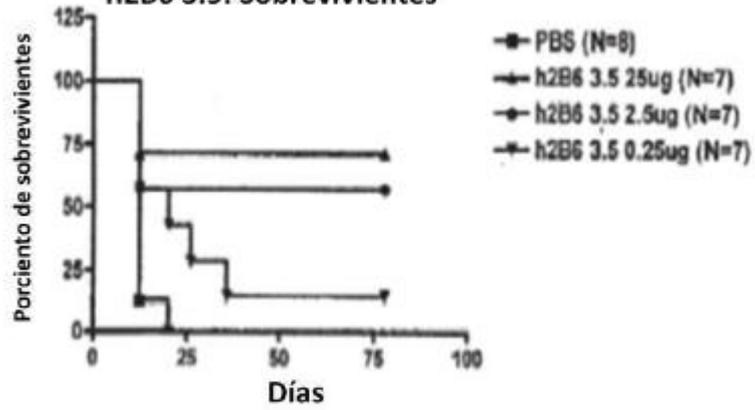


Figura 9A

Proporciones de sobrevivientes libres de tumor de h2B6 3.5: Sobrevivientes (Variante Fc)

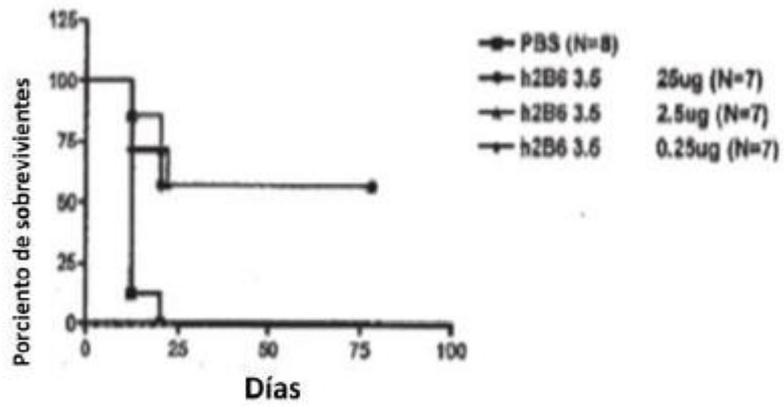


Figura 9B