

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 680**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2004 E 04786018 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1648513**

54 Título: **Utilización de anticuerpos que tienen una ADCC optimizada para tratar a los pacientes que responden débilmente al tratamiento por anticuerpos**

30 Prioridad:

**31.07.2003 FR 0309440**

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

**29.12.2014**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)  
Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des  
Tropiques  
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**BOUREL, DOMINIQUE;  
JORIEUX, SYLVIE;  
DE ROMEUF, CHRISTOPHE;  
KLEIN, PHILIPPE;  
GAUCHET, CHRISTINE;  
BIHOREAU, NICOLAS y  
GAUCHET, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 525 680 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

Utilización de anticuerpos que tienen una ADCC optimizada para tratar a los pacientes que responden débilmente al tratamiento por anticuerpos.

La presente descripción se refiere a la utilización de anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos de glicosilación específica que presentan una fuerte interacción para el receptor CD16 (FcgammaRIII) de las células efectoras del sistema inmunitario, y también la propiedad de inducir la secreción de citoquinas y de interleucinas, para tratar poblaciones de pacientes que responden débilmente a los tratamientos existentes y que presentan un polimorfismo particular de su CONDUCTO 16.

La inmunoterapia por medio de anticuerpos monoclonales se está convirtiendo en una de las estrategias más importantes e innovadoras de la medicina. Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos aparecen contrastados. En efecto, durante un cierto número de tratamientos, el anticuerpo monoclonal no parece ser lo bastante activo y/o eficaz. Numerosos ensayos clínicos se interrumpen debido a una falta de eficacia y a efectos secundarios incompatibles con una utilización en terapia clínica. Estos dos aspectos están estrechamente relacionados, sabiendo que unos anticuerpos poco activos y/o eficaces se administran en dosis altas para compensar la falta de eficacia y obtener una respuesta terapéutica. La administración de dosis altas induce entonces unos efectos secundarios. Además, es poco viable económicamente.

Estos problemas son principales en la industria de los anticuerpos monoclonales, en particular los anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Ahora bien, estos problemas se intensifican en poblaciones particulares de pacientes para los cuales el efecto terapéutico de los anticuerpos es significativamente más bajo comparado con la media de la población tratada. Estos pacientes se denominan comúnmente "pacientes de bajo nivel de respuesta".

Se sabe que la citotoxicidad celular mediada por los anticuerpos necesita, por un lado, la fijación de la porción Fab de los anticuerpos sobre su diana, así como la introducción de su dominio Fc en los receptores Fc de las células efectoras (RFc). En las células NK, el receptor responsable de esta actividad citotóxica es el CD16.

En base a estos conocimientos, se han llevado a cabo unos estudios con el fin de establecer una correlación entre las sub-poblaciones de pacientes refractarios (pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta") a la terapia con un anticuerpo específico de una patología a tratar y el polimorfismo de CD16.

En un estudio de 2000 (Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H, Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene, Blood. 1 de febrero de 2002; 99(3):754-8), la composición de la población de pacientes tratados con Rituxan® se analizó en función del polimorfismo del CD16 en la posición 158. Esta estaba compuesta por el 20% de FCGR3A-158V homocigotos (pacientes homocigotos para la valina en la posición 158 del CD16), por el 35% de FCGR3A-158F homocigotos (pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD16) y por el 45% de heterocigotos FCGR3A-158V/F (pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en la posición 158 del CD16). La actividad ADCC así como la eficacia clínica del anticuerpo anti-CD20 Rituxan® están correlacionados con el polimorfismo de CD16: los pacientes FCGR3A-158F homocigotos o heterocigotos FCGR3A-158V/F responden peor al tratamiento con Rituxan® que los pacientes FCGR3A-158V homocigotos.

Así, este estudio ha permitido demostrar que las diferencias de respuesta a los tratamientos con unos anticuerpos terapéuticos están asociadas a un polimorfismo del CD16. Sin embargo, este estudio no propone solución alguna para disminuir el efecto de este polimorfismo en los pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta" tratados con unos anticuerpos terapéuticos. No proporciona ninguna herramienta terapéutica adecuada para el tratamiento de los pacientes de bajo nivel de respuesta.

Por otra parte, se obtuvieron otros resultados al final de los estudios clínicos realizados con unos anticuerpos anti-Rhesus, que han mostrado que la eliminación de los hematíes Rhesus positivos por una IgG3 anti-D era más rápida en los pacientes FCGR3A-158F homocigotos (Kumpel BM, De Haas M, Koene HR, Van De Winkel JG, Goodrick MJ. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fcgamma RIIIa (CD16). Clin Exp Immunol. Abril de 2003; 132(1):81-6). Sin embargo, el bajo número de pacientes estudiados no permite llegar a una enseñanza técnica de este estudio.

El objetivo de la presente invención es proporcionar unos anticuerpos eficaces para tratar a los pacientes en los que fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente o que sufren unos efectos secundarios indeseables.

La solicitante ha descubierto que los anticuerpos cuyo dominio Fc presenta una estructura glicánica particular presentan una actividad citotóxica particularmente adaptada al tratamiento de los pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta", que no está afectada por el polimorfismo FCGR3A-158F homocigotos o FCGR3A-158V/F del aminoácido 158 del CD16, contrariamente a los anticuerpos producidos en CHO cuya actividad citotóxica está afectada por este polimorfismo. Además, la solicitante ha descubierto que estos anticuerpos inducen una producción

de citoquinas/quimioquinas, lo cual contribuye al refuerzo del efecto terapéutico estimulando unos mecanismos efectores del sistema inmunitario en los pacientes tratados.

5 La invención propone por lo tanto utilizar estos anticuerpos para el tratamiento de sub-poblaciones de pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta". Estos anticuerpos presentan una actividad ADCC y una producción de citoquina y/o quimioquinas hasta 100 veces superior a los anticuerpos disponibles en terapia.

### Descripción

10 Así, la invención se refiere a los objetos de las reivindicaciones 1 a 20.

La presente descripción describe asimismo la utilización de un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano optimizado, caracterizado por que:

- 15 a) está producido en una línea celular seleccionada por sus propiedades de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, o
- b) la estructura glicánica de la región Fc se modificó *ex vivo*, y/o
- 20 c) su secuencia primaria se modificó con el fin de aumentar su interacción frente a unos receptores Fc;

25 presentando dichos anticuerpos i) un porcentaje ADCC a través del CD16 (FcγRIIA) superior al 60%, 70%, 80% o preferentemente superior al 90% comparado con el mismo anticuerpo producido en una línea CHO o con un anticuerpo homólogo disponible en el comercio, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías en pacientes que presentan el polimorfismo del receptor CD16 FCGR3A-158V/F o FCGR3A-158F homocigotos y calificados como "de bajo nivel de respuesta" a las terapias con los anticuerpos disponibles actualmente.

30 Se entiende por pacientes "de bajo nivel de respuesta" los pacientes que presentan una reducción del 20 al 50% de la respuesta a los tratamientos con unos anticuerpos terapéuticos con respecto a los pacientes denominados "de alto nivel de respuesta", es decir a los pacientes que presentan una respuesta completa que corresponde a la desaparición de todos los síntomas y signos clínicos medibles de la enfermedad.

35 Por ejemplo, en el caso de un estudio de aclaramiento de los hematíes o de otro tipo celular en la circulación, se entiende por pacientes "de bajo nivel de respuesta" los pacientes que presentan un aclaramiento significativamente más amplio, con respecto a otro grupo de pacientes. En el tratamiento de las leucemias, se distingue:

- 40 \* los de nivel alto de respuesta con una respuesta completa que corresponde a la desaparición de todos los síntomas y de las señales medibles de la enfermedad, tanto desde el punto de vista del examen clínico como de los datos biológicos de laboratorios y de los estudios radiográficos. La disminución del tamaño de los tumores más grandes es superior al 75%.
- 45 \* los pacientes que responden parcialmente están descritos en el artículo Cheson BD *et al.*, Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. Abril de 1999; 17(4):1244. Review. Erratum in: J Clin Oncol junio de 2000; 18(11):2351.
- 50 \* los de bajo nivel de respuesta corresponden a pacientes que tienen un estado denominado estable, con menos del 50% de reducción de la masa tumoral, menos del 25% de aumento de las lesiones y sin nuevas lesiones. Este grupo de pacientes comprende también los pacientes para los cuales no se observa ninguna respuesta (progresión de la enfermedad que puede llegar hasta la muerte).

55 Así, para una sub-población de pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta" con respecto al polimorfismo del aminoácido 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos o FCGR3A-158V/F) u otro polimorfismo asociado a este polimorfismo del CD16, la eficacia del tratamiento es mejor con los anticuerpos optimizados de la invención, y se acerca a la de los pacientes denominados "de alto nivel de respuesta".

60 En efecto, la interacción del receptor para el Fc de los anticuerpos es diferente según los polimorfismos del CD16 (aa 158), teniendo el fenotipo FCGR3A-158V homocigoto una mejor afinidad que la forma FCGR3A-158F homocigoto y FCGR3A-158V/F heterocigoto. Los anticuerpos utilizados en el marco de la invención presentan una fuerte interacción con el CD16, lo cual puede explicar el hecho de que su actividad funcional no sea, o lo sea muy poco, afectada por el polimorfismo FCGR3A-158F homocigotos o FCGR3A-158V/F del CD16.

65 La invención se dirige por lo tanto a una población particular de pacientes que presentan un polimorfismo del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos o FCGR3A-158V/F), en particular de los pacientes en los que fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente y/o que sufren unos efectos secundarios indeseables que justifican la

administración del anticuerpo optimizado descrito aquí.

Las patologías tratadas en el marco de la invención no están limitadas a patologías particulares, pero se prefieren todas las patologías susceptibles de ser tratadas con unos anticuerpos monoclonales.

Además de una mejora muy significativa de la actividad ADCC de tipo CD16 (FcγRIIIA), el anticuerpo utilizado en el marco de la invención puede ser definido por que induce la secreción de por lo menos una citoquina por un tipo de células efectoras del sistema inmunitario que expresa el receptor CD16 superior al 50%, 100% o preferentemente superior al 200% comparado con el mismo anticuerpo producido en una línea CHO o comparado con un anticuerpo homólogo disponible en el comercio. El tipo de citoquina se selecciona de entre IL-1, IL-4, IL-12, IL-18, IL-21, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IFNα, IFNβ, TNFα, TGFβ, IP10 y TNF, IFNγ.

En el ámbito de la presente descripción, se muestra que los anticuerpos que presentan una fuerte interacción con el CD16 tienen la ventaja de inducir la producción de citoquinas, o de quimioquinas, en particular la producción de IFNγ. Las dos características antes citadas se complementan. En efecto, la producción de IFNγ o de otras citoquinas o quimioquinas, por unas células efectoras, inducida por los anticuerpos según la invención, puede reforzar el efecto terapéutico estimulando los mecanismos efectoras del sistema inmunitario en los pacientes tratados. El mecanismo de acción de dicha estimulación corresponde en particular a una regulación positiva autocrina de las células efectoras. Los anticuerpos que se enlazan al CD16 inducen una actividad citotóxica así como la producción de IFNγ o de otras citoquinas/quimioquinas, lo cual, al final, lleva a aumentar aún más la actividad citotóxica.

Preferentemente, este anticuerpo presenta un porcentaje ADCC superior a por lo menos el 100% comparado con el mismo anticuerpo producido en una línea CHO o con un anticuerpo homólogo disponible en el comercio, y un porcentaje de producción de por lo menos una citoquina por un tipo de células efectoras del sistema inmunitario que expresa el receptor CD16 superior a por lo menos el 100% comparado con el mismo anticuerpo producido en una línea CHO o con un anticuerpo homólogo disponible en el comercio.

Dichas citoquinas cuya liberación está inducida por los anticuerpos optimizados se seleccionan de entre las interleucinas, las citoquinas, las quimioquinas, los interferones y los factores de necrosis tumoral (TNF).

Así, el anticuerpo utilizado en el marco de la invención es capaz de inducir la secreción de por lo menos un tipo de citoquina seleccionada de entre IL-1, IL-4, IL-12, IL-18, IL-21, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IFNα, IFNβ, TNFα, TGFβ, IP10 y TNF, IFNγ, por las células efectoras del sistema inmunitario.

Preferentemente, el anticuerpo seleccionado presenta la capacidad de inducir la secreción de IFNγ o de otras citoquinas/quimioquinas por las células efectoras del sistema inmunitario que expresan el receptor CD16 o, más específicamente, de IL2 por la célula Jurkat CD16. El porcentaje de IFNγ o de otras citoquinas y/o quimioquinas segregadas expresa la capacidad de interacción de la región Fc del anticuerpo con el CD16 y expresa también su capacidad de unión con el antígeno. La secreción de IFNγ o de otras citoquinas y/o quimioquinas por las células del sistema inmunitario puede aumentar y/o inducir la actividad citotóxica de las células efectoras (NK, monocitos, macrófagos, neutrófilos polinucleares, etc.).

Las células efectoras pueden expresar un CD16 endógeno eventualmente modulable por las citoquinas y/o quimioquinas o factores de crecimiento, o ser transformadas. Se entiende por célula transformada, una célula modificada genéticamente, con el fin de expresar un receptor, en particular el receptor CD16.

En un modo de realización particular, el anticuerpo utilizado en el marco de la invención es capaz de inducir la secreción de por lo menos una citoquina por una célula leucocitaria, en particular de la familia de las células NK (Natural Killer) o por unas células de la línea mielo-monocitaria (monócitos-macrófagos y célula dendrítica).

Preferentemente, se utiliza para la selección de los anticuerpos una línea Jurkat transfectada con un vector de expresión que codifica el receptor CD16 como célula efectora. Esta línea es particularmente ventajosa ya que está inmortalizada y se mantiene en cultivo indefinidamente. El porcentaje de IL2 segregada expresa la capacidad de interacción de la región Fc del anticuerpo con el CD16 y expresa también su capacidad de unión con el antígeno.

Se pueden utilizar como célula efectora diferentes líneas Jurkat transfectadas con un vector de expresión que codifica para el receptor CD16, expresando dichas líneas cada una un CD16 particular.

Además, el anticuerpo optimizado puede ser preparado después de ser purificado y/o modificado *ex vivo*, en lo referente a la estructura glicánica de su región Fc. Para ello, se puede utilizar cualquier medio químico, cromatográfico o enzimático apropiado para modificar la estructura glicánica del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden purificar unos anticuerpos obtenidos de diversas fuentes y añadir en una mezcla de reacción una o varias glicosiltransferasa(s), en particular una galactosil-transferasa, e incubar durante un tiempo determinado hasta la obtención de los anticuerpos que presentan la estructura glicánica descrita anteriormente.

La selección se puede llevar a cabo sobre unos anticuerpos producidos por unas células utilizadas habitualmente

para la producción de anticuerpos terapéuticos, tales como las líneas de mielomas de rata, en particular YB2/0 y sus derivados, las células linfoblastoides humanas, las células de insectos, las células de mielomas murinos, los hibridomas así como las células eucariotas, como por ejemplo las levaduras.

5 Es posible producir asimismo los anticuerpos en una línea de células de mamíferos modificada genéticamente, por ejemplo CHO modificada genéticamente, por introducción de una o varias secuencia(s) que expresan una o varias glicosiltransferasa(s), en particular seleccionadas de entre una enzima implicada en la modificación de las cadenas oligosacáridicas en la posición 1 de la fucosa unida en alfa en la posición 6 del residuo N-acetilglucosamina en el extremo reductor, en particular una 1,6-fucosiltransferasa, y una galactosil-transferasa. La selección puede también  
10 ser aplicada a la evaluación de anticuerpos producidos por unas plantas transgénicas o unos mamíferos transgénicos.

Para ello, la producción en CHO sirve de referencia (siendo CHO empleada para la producción de anticuerpos medicamento) para comparar y seleccionar los sistemas de producción que conducen a los anticuerpos utilizados en el marco de la invención. Una comparación con unos anticuerpos policlonales puede también ser útil en los ensayos de eficacia de los anticuerpos monoclonales. Así, para una subpoblación de pacientes denominados "de bajo nivel de respuesta" en relación con el polimorfismo del aminoácido 158 del CD16 u otro polimorfismo asociado a este polimorfismo, la eficacia del tratamiento es mejor con los anticuerpos optimizados utilizados en el marco de la invención, y se parece a la de los pacientes denominados "de alto nivel de respuesta". Se muestra que la actividad funcional de los anticuerpos monoclonales optimizados se parecen a la de los anticuerpos policlonales terapéuticos. Así, en algunos ensayos terapéuticos, los anticuerpos policlonales pueden ser utilizados como controles en los ensayos de eficacia de anticuerpos monoclonales de diferentes orígenes. Esto permite seleccionar los anticuerpos monoclonales destinados al tratamiento de sub-poblaciones de pacientes de bajo nivel de respuesta.

25 Así, en algunos ensayos terapéuticos, los anticuerpos policlonales pueden ser utilizados como controles en los ensayos de eficacia de anticuerpos monoclonales de diferentes orígenes. Esto permite seleccionar unos anticuerpos monoclonales destinados al tratamiento de sub-poblaciones de pacientes de bajo nivel de respuesta. Otra alternativa consiste en efectuar la comparación con los anticuerpos disponibles en el comercio, en particular los anticuerpos en curso de desarrollo, los anticuerpos que han obtenido una AMM o también unos anticuerpos cuyos ensayos clínicos se detuvieron y que mostraron ser poco eficaces y/o que producen unos efectos secundarios indeseables a las dosis administradas. En efecto, los anticuerpos modificados utilizados en el marco de la invención son por lo menos el 100% más eficaces para activar la ADCC soportada por las células efectoras del sistema inmunitario, lo cual implica unas dosis de administración inferiores a las utilizadas por los anticuerpos mencionados anteriormente y, en el presente caso, la posibilidad de tratar unos pacientes para los cuales los anticuerpos disponibles actualmente se mostraron ineficaces.

El anticuerpo puede, en una primera etapa, ser seleccionado por su capacidad de interacción con el receptor CD16 y después ser ensayado y seleccionado tal como se ha descrito anteriormente por sus propiedades para inducir la producción de una citoquina, en particular la IL-2, por las células Jurkat CD16 o de IFN $\gamma$  por las células efectoras que expresan el CD16.

Unos anticuerpos de este tipo que poseen esta doble propiedad de inducir la ADCC a través del CD16 e inducir la producción de IFN $\gamma$  o de otras citoquinas y/o quimioquinas por las células del sistema inmunitario pueden aumentar y/o inducir la actividad citotóxica de las células efectoras (en particular NK, monocitos, macrófago, neutrófilos polinucleares).

Así, la presente descripción describe la utilización del anticuerpo definido anteriormente para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías en pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD 16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).

Dichos anticuerpos poseen una glicosilación particular. Poseen un dominio Fc de tipo biantenado, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de unión terminales no intercalares y una baja fucosilación.

55 Así, en otro aspecto, la presente descripción describe la utilización de un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano cuya estructura glicánica del dominio Fc del anticuerpo corresponde a un tipo biantenado, con cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de unión terminales no intercalares, y una baja fucosilación para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías en pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).

En efecto, esta forma glicánica del dominio Fc del anticuerpo confiere a éste las propiedades de inducir una fuerte ADCC y la producción de citoquinas y/o quimioquinas tal como se ha descrito anteriormente.

65 En este anticuerpo, el porcentaje de GlcNAc intercalar es no nulo.

En el marco de la invención, se utilizan unas composiciones que presentan un contenido superior al 60%, preferentemente superior al 80% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido en formas G0F + G1F inferior al 50%, preferentemente inferior al 30% para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o de los

5

Ventajosamente, los anticuerpos mencionados anteriormente son unas IgG1.

Otro objeto de la presente descripción es un procedimiento de tratamiento terapéutico que comprende la administración de un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano cuya estructura glicánica del dominio Fc del anticuerpo corresponde a un tipo biantenado, con cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de unión terminales no intercalares, y una baja fucosilación en pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).

10

15

Ventajosamente, los pacientes son unos pacientes homocigotos para la fenilalanina en la posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos).

Preferentemente, en los pacientes tratados fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente o sufren unos efectos secundarios indeseables.

20

Ventajosamente, la dosis del anticuerpo administrada al paciente es 2 veces, 5 veces, preferentemente 10 veces, 25 veces, 50 veces o preferentemente 100 veces menos elevada que una dosis indicada con un anticuerpo de igual especificidad pero de glicosilación diferente o producido en una línea CHO.

25

De manera ventajosa, la dosis del anticuerpo administrada al paciente es entre 2 y 5 veces, entre 5 y 10 veces, entre 5 y 25 veces, entre 5 y 50 veces, o preferentemente entre 5 y 100 veces menos elevada que una dosis de un anticuerpo de misma especificidad pero de glicosilación diferente o producido en una línea CHO.

30

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede ser producido en unas líneas celulares de tipo mieloma de rata, por ejemplo YB 2/0 (ATCC n° CRL 1662). En efecto, dichas células permiten la obtención de un anticuerpo glicosilado tal como se ha descrito anteriormente. Así, en un aspecto complementario, la presente descripción se refiere a la utilización de un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano producido en una línea de mieloma de rata, por ejemplo YB2/0 o uno de sus derivados, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de pacientes que presentan la forma FCGR3A-158V/F o FCGR3A-158F homocigotos del CD16, en particular de los pacientes en los que fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente o que sufren unos efectos secundarios indeseables que justifican la administración del anticuerpo optimizado de la invención. Preferentemente, la presente descripción se refiere a la utilización de anticuerpos producidos en líneas de mielomas de rata, en particular YB2/0 y sus derivados. Dichos anticuerpos que poseen la doble propiedad de inducir a través del CD16 de forma FCGR3A-158V/F o FCGR3A-158F homocigotos, el ADCC y también la producción de IFN $\gamma$  o de otras citoquinas y/o quimioquinas por las células del sistema inmunitario, pudiendo esto incrementar y/o inducir la actividad citotóxica de células efectoras (NK, monocitos, macrófagos, neutrófilos polinucleares, etc.) descritos por expresar el receptor CD16, se utilizan para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una población particular de pacientes de bajo nivel de respuesta o en los que fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente o que sufren unos efectos indeseables. El anticuerpo producido en unas líneas de mieloma de rata, en particular YB2/0 o uno de sus derivados, presenta la estructura glicánica del fragmento Fc tal como se ha descrito anteriormente, el contenido en formas G0+G1+G0F+G1F y G0F+G1F tal como se ha descrito anteriormente, e induce a una citotoxicidad por ADCC y a la secreción de citoquinas de la manera ya descrita anteriormente.

35

40

45

50

El anticuerpo utilizado en el marco de la invención puede ser dirigido contra un antígeno no ubicuo presente en unas células de donante sano (por ejemplo el anticuerpo es de especificidad anti-Rhesus del glóbulo rojo humano), o un antígeno de una célula patológica o de un organismo patógeno para el ser humano, en particular contra un antígeno de una célula cancerosa o infectada por un virus. Es ventajoso utilizar los anticuerpos definidos anteriormente para el tratamiento de los cánceres y de las infecciones por unos agentes patógenos para estos pacientes.

55

Entre las patologías que necesitan la administración de dichos anticuerpos en estos pacientes, se pueden citar a título de ejemplo las enfermedades seleccionadas de entre la enfermedad hemolítica del recién nacido y las que escapan a la respuesta inmune, en particular el síndrome de Sezary, las leucemias mieloides crónicas, las leucemias linfoides crónicas (LLC-B), los tumores sólidos, el cáncer de mama, las patologías relacionadas con el medio ambiente, que afectan particularmente a las personas expuestas a los bifenilos policlorinados, las enfermedades infecciosas, en particular la tuberculosis, el síndrome de la fatiga crónica (CFS), las infecciones parasitarias como por ejemplo las esquistosómulas o el paludismo, en particular en las mujeres embarazadas, y las infecciones virales para determinar las células reservorios de virus (VIH, NHC, VBH particularmente) y las células infectadas.

60

65

Entre las patologías tratadas, se pueden citar las patologías en las que el antígeno está poco expresado (antígeno Rhesus D sobre hematíes, leucemias, leucemia linfocítica crónica B (LLC-B), por ejemplo). Se entiende por "antígeno poco expresado" un número de sitios antigénicos inferior a 250000, preferentemente inferior a 100000 o 50000, y de manera particularmente ventajosa inferior a 10000 o 5000 por célula diana.

5 En un aspecto particular, la invención se dirige a pacientes que presentan la forma FCGR3A-158V/F o FCGR3A-158F homocigota del CD16 y que padecen LLC-B. Al estar el CD20 muy poco expresado en las linfocitos Tumorales, es particularmente ventajosa la utilización de anticuerpos anti-CD20 según la invención para tratar a estos pacientes.

10 Entre los cánceres, se consideran más particularmente los cánceres de las células HLA clase II positivas, los linfomas de células B, las leucemias agudas de células B, el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin, las leucemias mieloides, las leucemias linfocíticas crónicas (LLC-B), los linfomas y leucemias de linfocitos T, los linfomas no hodgkinianos y las leucemias mieloides crónicas.

15 El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-HLA-DR o un anti-CD20.

En un aspecto particular de la invención, cuando el anticuerpo es un anti-CD20, el anticuerpo se administra ventajosamente a una dosis inferior a 187,5 mg/kg, a 75 mg/kg, a 37,5 mg/kg, 15 mg/kg, 7,5 mg/kg o de manera preferida inferior a 3,75 mg/kg. La dosis administrada está ventajosamente comprendida entre 187,5 mg/kg y 75 mg/kg, o entre 75 mg/kg y 37,5 mg/kg, entre 75 mg/kg y 15 mg/kg, entre 75 mg/kg y 7,5 mg/kg y de manera preferida entre 75 mg/kg y 3,75 mg/kg, o también entre 15 mg/kg y 3,75 mg/kg.

De manera ventajosa, este anticuerpo presenta un porcentaje ADCC superior al 100% y un porcentaje de producción de IL-2 por la célula Jurkat CD16 superior, hasta el 1000% comparado con Rituxan®.

25 El anti-CD20 utilizado en el marco de la invención puede ser producido en una línea de mieloma de rata, en particular YB2/0.

Además, a título de ejemplo, los anticuerpos utilizados en el marco de la invención pueden ser unos anticuerpos de segunda generación, que corresponden a los anticuerpos disponibles actualmente, listados en la tabla 1.

Tabla 1

Nombre y marca comercial del anticuerpo	Compañía	Diana	Indicación
Edrecolomab PANOREX Rituximab RITUXAN	Centocor Idec cedido a Genentech/ Hoffman la roche	anti Ep-CAM anti CD20	Cáncer colorrectal linfoma de linfocitos B púrpura trombocitopénica
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech cedido a Hoffman la roche/Immunogen	anti HER2	Cáncer de ovarios
Palivizumab SYNAGIS	Medimmune cedido a Abott		RSV
Alemtuzumab CAMPATH	BTG cedido a Schering	anti CD52	leucemia
ibritumomab tiuxetan ZEVALIN	IDEC cedido a Schering	anti CD20	NHL
Cetuximab IMC-C225	Merck /BMS / Imclone	anti HER1	cánceres
Bevacizumab AVASTIN	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGF	Cánceres de pulmón, colorrectal, renal
Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	Cánceres: linfoma no hodgkiniano
Hu M195Mab MDX-210	Protein Design Labs Medarex/Immuno-Designed	ND Bi específico HER2Neu/C D64	Cánceres de mama, ovario, próstata
BEC2 Mitumomab	Moléculas Imclone	anti GD3	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
Oregovomab OVAREX	Altarex	anti CA125	Cáncer de ovario
Ecomeximab KW-2971	Kyowa-Hakko	anti GD	melanoma maligno
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cánceres
MDX010	Medarex	ND	cánceres
XTL 002	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral: HCV
H11 SCFV	viventia biotech	ND	cánceres
4B5	viventia biotech	anti GD2	cánceres
XTL 001	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral: HBV
MDX-070	MEDAREX	Anti-PSMA	Cáncer de próstata
TNX-901	TANOX	anti CD-23	
IDEC-114	IDEC	Inhibición ProteinC	linfoma no hodgkiniano

Otros anticuerpos pueden ser seleccionados de entre los anti Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 y anti ProteinC; anti-KIR3DL2, anti-EGFR, anti-CD25, anti-CD38, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD44, unos anti-idiotipos específicos de inhibidores, por ejemplo de factores de coagulación, los antivirales: HIV, HBV, HCV y RSV.

En un aspecto preferido, el anticuerpo es un anti-HLA-DR. Este anticuerpo presenta un porcentaje ADCC superior al 100% y un porcentaje de producción de IL2 por la célula Jurkat CD16, o de IFN $\gamma$  por una célula efectora del sistema inmunitario que expresa el receptor CD16 superior hasta 1000 comparado con el mismo anticuerpo expresado en la línea CHO, línea de expresión del Remitogen<sup>®</sup>.

El anti-HLA-DR puede ser producido en una línea de mieloma de rata, en particular YB2/0.

La presente descripción se refiere también a la utilización de un anticuerpo descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a inducir la expresión de IL-1, IL4, IL12, IL18, IL21, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IP10 e IFN $\gamma$  por las células efectoras naturales del sistema inmunitario, siendo dicho medicamento útil en particular para el tratamiento del cáncer y de las infecciones en los pacientes en los que fracasa el tratamiento con los anticuerpos disponibles actualmente o que sufren unos efectos secundarios indeseables que justifican la administración del anticuerpo optimizado de la invención, y en particular que presentan la forma V/F158 o F/F158 del CD16.

Se describirán otros aspectos y ventajas de la invención en los ejemplos siguientes, que deben ser considerados como ilustrativos.

#### Leyenda de las figuras

Figura 1: Actividad ADCC del anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D R297 (IgG1 T125 producido en YB2/0) y de los anticuerpos policlonales WinRho en presencia de células efectoras (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) de diferentes donantes de sangre y de inmunoglobulinas polivalentes (Tegelina 500  $\mu$ g/ml).

Figura 2: ADCC inducida por los anticuerpos anti-Rhesus D (anticuerpos WinRho policlonales, T125 producidos en YB/2/0 y T125 producidos en CHO) sobre unas células NK de donantes de fenotipo CD16 FCGR3A-158F homocigotos.

Figura 3: ADCC inducido por los anticuerpos anti-Rhesus D (anticuerpos WinRho policlonales, T125 producidos en YB/2/0 y T125 producidos en CHO) sobre unas células NK de donantes de fenotipo CD16 FCGR3A-158V homocigotos.

Figura 4: activación de Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos por los anticuerpos anti-Rhesus D T125 expresados en YB2/0 y CHO.

Figura 5: activación de Jurkat CD16 FCGR3A-158V homocigotos por los anticuerpos anti-Rhesus D T125 expresados en YB2/0 y CHO.

Figura 6: activación de Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos inducida por los anticuerpos anti-HLA-DR expresados en YB2/0 y CHO.

Figura 7: activación de Jurkat CD16 FCGR3A-158V homocigotos inducida por los anticuerpos anti-HLA-DR expresados en YB2/0 y CHO.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1: Actividad ADCC del anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D R297 comparada con los anticuerpos policlonales anti-D sobre un grupo de 107 donantes de sangre.

Se comparan las capacidades respectivas del anticuerpo monoclonal anti-Rhesus D R297 y de los anticuerpos policlonales anti-D para lisar los hematíes en presencia de células efectoras de diferentes donantes individuales (figura 1).

Las células efectoras proceden de un grupo de 107 donantes de sangre. Las células mononucleadas (PBMC) son aisladas a partir de una bolsa de sangre por centrifugación sobre un gradiente de Ficoll (Pack Plus Pharmacia). Las plaquetas son eliminadas por centrifugación (190 g, 15 minutos) y los glóbulos rojos residuales son lisados con NH<sub>4</sub>Cl. Las células son lavadas y resuspendidas a 8x10<sup>7</sup> células/ml en IMDM. Los glóbulos rojos obtenidos a partir de concentrados terapéuticos (grupo O, Rhesus+) son tratados durante 10 minutos con papaína (1 mg/ml) y después lavados tres veces en tampón salino y ajustados a la concentración de 4x10<sup>7</sup>/ml o 2x10<sup>7</sup>/ml (ensayo NK) en IMDM.



El ensayo se efectúa en placa de 96 pocillos (NUNC). Los sobrenadantes de cultivo o los anticuerpos purificados (100 µl a 200 ng/ml en IMDM + 0,5% de SVF), las células efectoras (25 µl), los glóbulos rojos (25 µl) y las inmunoglobulinas polivalentes (Tegelina, LFB) (50 µl) se incuban durante 16 h a 37°C bajo atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> %. Para la lisis no específica, las células efectoras son sustituidas por IMDM. Después de 16h a 37°C, las placas se centrifugan. Se extraen 60 µl de sobrenadante y se mezclan con 60 µl de 2,7-diaminofluoreno (DAF, Sigma).

Después de 5 minutos, se mide la DO a 620 nm. El porcentaje de lisis se estima utilizando una curva de calibración obtenida con diferentes diluciones de glóbulos rojos lisados con NH<sub>4</sub>Cl, que corresponde al 100, 75, 50, 25 y 0% de lisis respectivamente.

En base al estudio genotípico realizado sobre unos donantes de mismo origen geográfico, se estima en el presente estudio que la distribución media de los 107 donantes, en lo referente al polimorfismo del CD16 es de 27 FCGR3A-158F homocigotos, 20 FCGR3A-158V homocigotos y 60 FCGR3A-158V/F.

Los resultados muestran una gran variabilidad en la capacidad de las células efectoras de los diferentes sujetos para inducir una lisis de los hematíes Rhesus positivos, sean cuales sean los anticuerpos ensayados. Los anticuerpos expresados en la línea celular YB2/0 presentan una actividad citolítica comparable con la de los anticuerpos policlonales, sea cual sea el donante estudiado, y por lo tanto sea cual sea el polimorfismo del CD16 de las células efectoras del donante (véase la figura 1).

### **Ejemplo 2: Eficacia ADCC de los anticuerpos producidos en CHO e YB2/0 en función del polimorfismo del CD16.**

Se transfectó la misma secuencia que codifica para una IgG1 específica del antígeno Rhesus D en las líneas celulares CHO e YB2/0. Los anticuerpos se incubaron con los hematíes Rhesus positivo (células dianas) y unas células NK que proceden de 6 donantes diferentes (3 FCGR3A-158V homocigotos y 3 FCGR3A-158F homocigotos) previamente genotipados por su fenotipo CD16 en la posición 158. Las células Nk son aisladas utilizando la técnica de separación de bolas magnéticas (MACS) de Myltenyi. Las células NK son lavadas y resuspendidas a  $2 \times 10^7$ /ml y/o  $6 \times 10^7$ /ml en IMDM. Los glóbulos rojos son ajustados a la concentración de  $2 \times 10^7$ /ml en IMDM. La Tegelina se sustituye por IMDM. Fuera de estas modificaciones, el ensayo es idéntico al ensayo de ADCC con PBMC.

Se evaluó la actividad citotóxica de los anticuerpos sobre los hematíes (ADCC) (figura 2 y figura 3).

El anticuerpo producido en la línea CHO induce a una lisis más baja que el anticuerpo producido en YB2/0, sea cual sea el fenotipo del donante. El anticuerpo R297 expresado en la línea YB2/0 induce, a partir de las concentraciones más bajas, una actividad citolítica más alta. A la concentración máxima de 25 ng/ml, los dos anticuerpos inducen el mismo porcentaje de ADCC.

A las concentraciones inferiores a 25 ng/ml, la diferencia de lisis entre el anticuerpo producido en CHO y el producido en YB2/0 es más importante en los donantes FCGR3A-158F homocigotos que en los donantes FCGR3A-158V homocigotos. A la concentración de 2,5 ng/ml, en presencia de células NK FCGR3A-158V homocigotos, el anticuerpo producido por CHO induce el 54% de lisis mientras que el producido por YB2/0 induce el 89% de lisis, es decir con un 56% de aumento. Por el contrario, a la misma concentración, en presencia de células NK FCGR3A-158F homocigotos, el anticuerpo producido por CHO induce sólo el 22% de lisis, mientras que el producido por YB2/0 induce el 74% de lisis, es decir con un 236% de aumento.

El anticuerpo expresado en la línea YB2/0 parece por lo tanto ser un producto mucho mejor para tratar a los pacientes que dan una lisis baja con los anticuerpos producidos en CHO. Así, la diferencia de actividad ADCC entre los pacientes FCGR3A-158V homocigotos y FCGR3A-158F homocigotos es más débil con el anticuerpo expresado en YB2/0 (89 y 74%) con respecto a la observada con el anticuerpo expresado en CHO (56 y 22%).

Los anticuerpos optimizados presentan una respuesta que parece por lo tanto menos dependiente de las formas polimórficas del CD16.

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal expresado en YB2/0 induce siempre una lisis superior o igual a los anticuerpos policlonales.

### **Ejemplo 3: Comparación de la activación de células Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos y Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos inducida por los anticuerpos anti-Rhesus producidos en CHO e YB2/0 respectivamente: evaluación de la producción de IL2.**

Este ensayo estima la capacidad de los anticuerpos para fijarse sobre el receptor CD16 (Fc gamma RIII) expresado en las células Jurkat CD16 y para inducir la secreción de IL2.

La misma secuencia que codifica una IgG1 (T125) específica del antígeno Rhesus D se transfectó en las líneas

celulares CHO e YB2/0. Los anticuerpos son incubados con hematíes Rhesus positivo (célula diana) y unas células Jurkat CD16 (células efectoras). Se han utilizado dos tipos de células Jurkat: 1- unas linfocitos Transfectadas con el gen que codifica para un RFc que lleva el aminoácido fenilalanina F en la posición 158 (forma F), 2- unas linfocitos Transfectadas con el gen que codifica para un RFc que lleva el aminoácido valina V en la posición 158 (forma V). La cantidad de citoquina (IL2) segregada por las células Jurkat CD16 se midió por ELISA.

En una placa de 96 pocillos en mezcla:

Anticuerpos: 50 µl de una dilución de 50; 37,5; 25; 18,75; 12,5; 9,4; 6,25; 3,125 ng/ml en IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's) Medium 5% SVF (suero de ternera fetal)

- PMA 50 µl de una dilución a 40 ng/ml en IMDM 5% SVF
- Hematíes tratados con papaína. 50 µl a  $8 \times 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF
- Jurkat CD16. 50 µl a  $2 \times 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF

Incubación durante 1 noche a 37°C

Después de la centrifugación de las placas, extracción de 100 µl de sobrenadantes y ensayo de IL2 con el kit comercial (Quantikine de R/D). Lectura a 450 nm.

El anticuerpo expresado en la línea YB2/0 es capaz de inducir una secreción más fuerte de IL2, contrariamente al anticuerpo expresado en CHO, y sea cual sea el fenotipo CD16 (figura 4 y figura 5).

El anticuerpo producido en CHO no induce ninguna secreción de IL2 a partir de Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos y sólo una producción muy baja de IL2 con la forma FCGR3A-158V homocigotos.

Siendo una de las particularidades del sistema Rhesus la baja expresión del antígeno en la superficie membranaria, parece que en estas condiciones, el anticuerpo expresado en la línea YB2/0 demuestra ser un producto mucho mejor para activar las células efectoras portadoras de la forma FCGR3A-158F homocigotos del CD16 que no parecen activables con el anticuerpo producido en CHO. En lo referente a la forma FCGR3A-158V homocigotos, unas cantidades muy bajas de anticuerpos producidos por YB2/0 (<1,56) permiten inducir una activación comparable a la obtenida con concentraciones más altas de anticuerpos producidos en CHO (12,5 ng/ml).

Con la forma FCGR3A-158F homocigotos y a la concentración de 12,5 ng/ml, el anticuerpo producido en CHO induce una secreción de IL2 (18 pg/ml) inferior al 2% de la inducida por el anticuerpo producido en YB2/0 (1435 pg/ml). Esto corresponde a un incremento de más del 7000% cuando se utiliza el anticuerpo producido en YB2/0 con respecto al anticuerpo producido en CHO.

Con la forma FCGR3A-158V homocigotos y a la concentración de 12,5 ng/ml, el anticuerpo producido en CHO induce una secreción de IL2 (869 pg/ml) inferior al 8% de la inducida por el anticuerpo producido en YB2/0 (12312 pg/ml). Esto corresponde a un incremento de más del 1300% cuando se utiliza el anticuerpo producido en YB2/0 con respecto al anticuerpo producido en CHO.

**Ejemplo 4: Comparación de la activación de células Jurkat CD16 FCGR3A-158F homocigotos y Jurkat CD16 FCGR3A-158V homocigotos inducida por dos anticuerpos anti-HLA-DR expresados en CHO y YB2/0 respectivamente: evaluación de la secreción de IL2.**

La misma secuencia que codifica para una IgG1 específica del antígeno HLA-DR se transfectó en las líneas celulares CHO e YB2/0. Los anticuerpos se incuban con unas células Raji (célula diana HLA-DR positivas) y unas células Jurkat CD16 (células efectoras). Se han utilizado dos tipos de células Jurkat: 1- unas linfocitos Transfectadas con el gen que codifica para un RFc que lleva el aminoácido fenilalanina F en la posición 158 (forma F), 2- unas linfocitos Transfectadas con el gen que codifica para un RFc que tiene el aminoácido valina V en la posición 158 (forma V). La cantidad de citoquinas (IL2) segregada por las células Jurkat CD16 se midió por ELISA.

En una placa de 96 pocillos en mezcla:

Anticuerpos: 50 µl de una dilución de 50; 37,5; 25; 18,75; 12,5; 9,4; 6,25; 3,125 ng/ml en IMDM 5% SVF

- PMA 50 µl de una dilución a 40 ng/ml en IMDM 5% SVF
- Células Raji: 50 µl a  $6 \times 10^5$ /ml en IMDM 5% SVF
- Jurkat CD16. 50 µl a  $20 \times 10^6$ /ml en IMDM 5% SVF

Incubación durante 1 noche a 37°C

Después de la centrifugación de las placas, extracción de 100 µl de sobrenadantes y ensayo de IL2 con el kit comercial (Quantikine de R/D). Lectura a 450 nm.

El anticuerpo expresado en la línea YB2/0 es capaz de inducir una secreción más fuerte de IL2, contrariamente al anticuerpo expresado en CHO, sea cual sea el fenotipo CD16 (figura 6 y figura 7).

5 Contrariamente al sistema Rhesus sobre los hematíes, la expresión del antígeno HLA-DR en la superficie  
membranaria de la célula Raji no es baja (de 200000 a 400000 copias). En estas condiciones, parece que el  
anticuerpo expresado en la línea YB2/0 demuestra ser un producto mucho mejor para activar las células efectoras  
portadoras de la forma F158, así como V158 del CD16 y más particularmente a las bajas concentraciones de  
10 anticuerpos. Así, a la concentración de 1,56 ng/ml, el anticuerpo producido en CHO induce a una secreción de IL2  
(2410 pg/ml) inferior al 15% de la inducida por el anticuerpo producido en YB2/0 (16952 pg/ml). Esto corresponde a  
un incremento de más del 600% cuando se utiliza el anticuerpo producido en YB2/0 con respecto al anticuerpo  
producido en CHO.

15 A la concentración de 12,5 ng/ml, el anticuerpo producido en CHO induce a una secreción de IL2 (14597 pg/ml)  
inferior al 45% de la inducida por el anticuerpo producido en YB2/0 (34823 pg/ml). Esto corresponde a un incremento  
de más del 100% cuando se utiliza el anticuerpo producido en YB2/0 con respecto al anticuerpo producido en CHO.

20 El anticuerpo expresado en la línea YB2/0 demuestra ser por lo tanto ser un producto mucho mejor para inducir la  
secreción de citoquinas de células efectoras portadoras de la forma polimórfica V158 (FCGR3A-158V homocigotos)  
y F158 (FCGR3A-158F homocigotos).

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o de los pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
2. Utilización de una composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano anti-Rhesus del glóbulo rojo humano, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido en pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
3. Utilización de una composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano dirigido contra un antígeno de una célula cancerosa, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer en pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que el anticuerpo es un anti-HLA-DR o un anti-CD20.
5. Utilización según la reivindicación 4, caracterizada por que el medicamento está destinado al tratamiento de los cánceres de las células HLA clase II positivas, de los linfomas de células B, de las leucemias agudas de células B, de los linfomas de Burkitt, del linfoma de Hodgkin, de las leucemias mieloides, de las leucemias linfoides crónicas B (LLC-B), de los linfomas y leucemias de linfocitos T, de los linfomas no hodgkinianos y de las leucemias mieloides crónicas.
6. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que el anticuerpo es un anticuerpo seleccionado de entre los anti Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 y anti ProteinC, anti-KIR3DL2, anti-EGFR, anti-CD25, anti-CD38, anti-CD30, anti-CD33, y anti-CD44.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que dicha composición presenta un contenido superior al 80% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F.
8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que las formas G0F + G1F son inferiores al 30%.
9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que los anticuerpos son unas IgG1.
10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que los pacientes son unos pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos)
11. Composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para su utilización en el tratamiento de los pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o de los pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
12. Composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano anti-Rhesus del glóbulo rojo humano, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para su utilización en el tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido en pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
13. Composición de anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano dirigido contra un antígeno de una célula cancerosa, presentando dicha composición un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F y un contenido para las formas G0F + G1F inferior al 50%, para su utilización en el tratamiento de un cáncer en pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos) o en pacientes heterocigotos valina/fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158V/F).
14. Composición según la reivindicación 13, para su utilización según la reivindicación 13, caracterizada por que el anticuerpo es un anti-HLA-DR o un anti-CD20.

- 5 15. Composición según la reivindicación 14, para su utilización según la reivindicación 14, caracterizada por que el medicamento está destinado al tratamiento de los cánceres de las células HLA clase II positivas, de los linfomas de células B, de las leucemias agudas de células B, de los linfomas de Burkitt, del linfoma de Hodgkin, de las leucemias mieloides, de las leucemias linfoides crónicas B (LLC-B), de los linfomas y leucemias de linfocitos T, de los linfomas no hodgkinianos y de las leucemias mieloides crónicas.
- 10 16. Composición según la reivindicación 13, para su utilización según la reivindicación 13, caracterizada por que el anticuerpo es un anticuerpo seleccionado de entre los anti Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 y anti ProteinC, anti-KIR3DL2, anti-EGFR, anti-CD25, anti-CD38, anti-CD30, anti-CD33, y anti-CD44.
- 15 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, caracterizada por que dicha composición presenta un contenido superior al 80% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F.
- 20 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, caracterizada por que las formas G0F + G1F son inferiores al 30%.
19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, caracterizada por que los anticuerpos son unas IgG1.
- 20 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, caracterizada por que los pacientes son unos pacientes homocigotos para la fenilalanina en posición 158 del CD16 (FCGR3A-158F homocigotos).

ADCC en presencia de células efectoras (PBMC) de diferentes donantes de sangre y de inmunoglobulinas polivalentes (Tegelina 500 µg/ml).

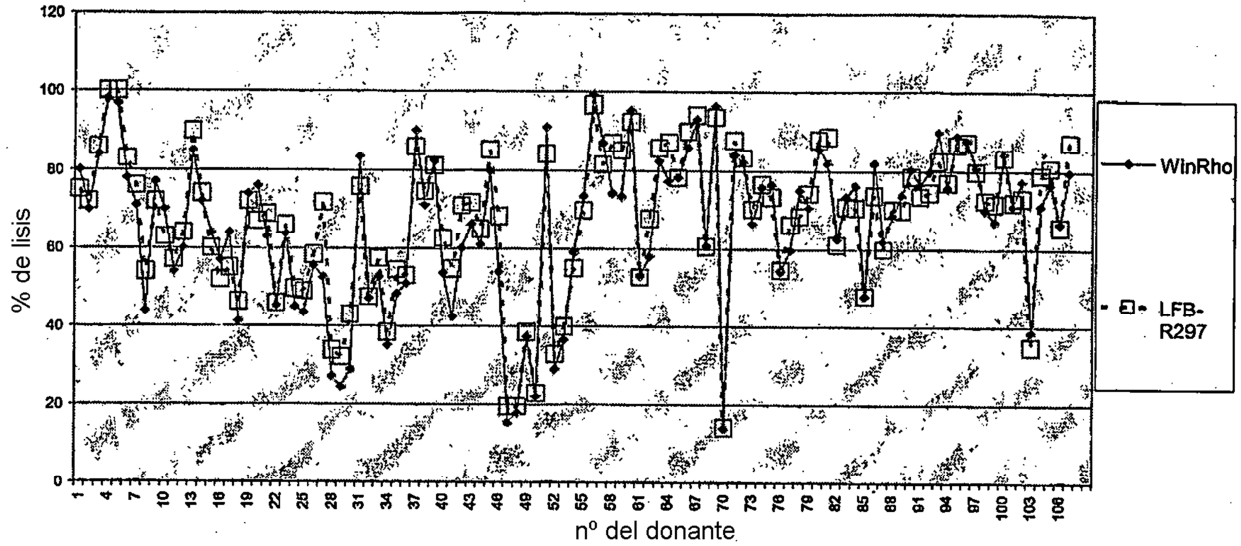


Figura 1

ADCC inducida por los anti-Rhesus D sobre NK de donantes de fenotipo CD16 F-F 158

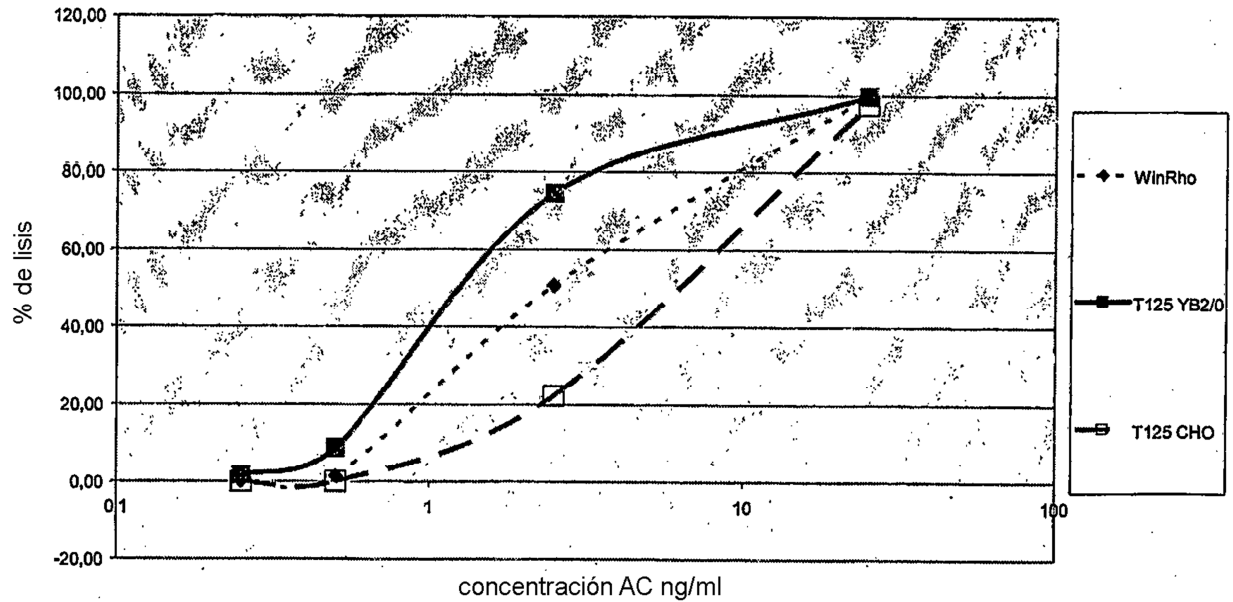
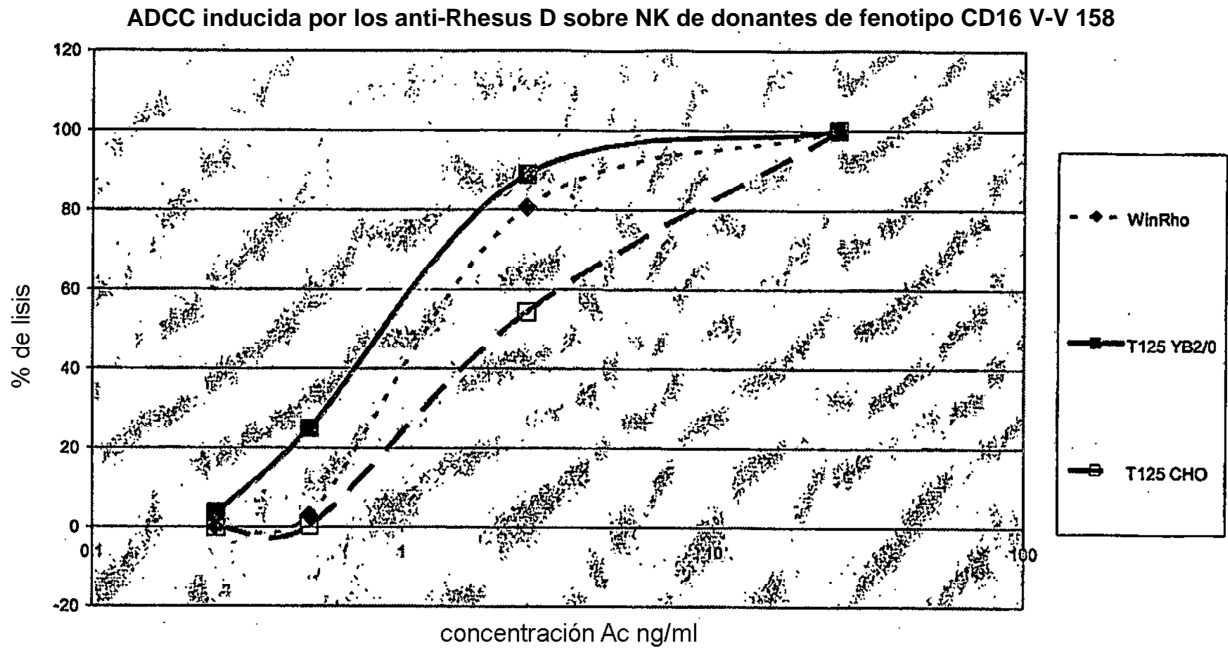
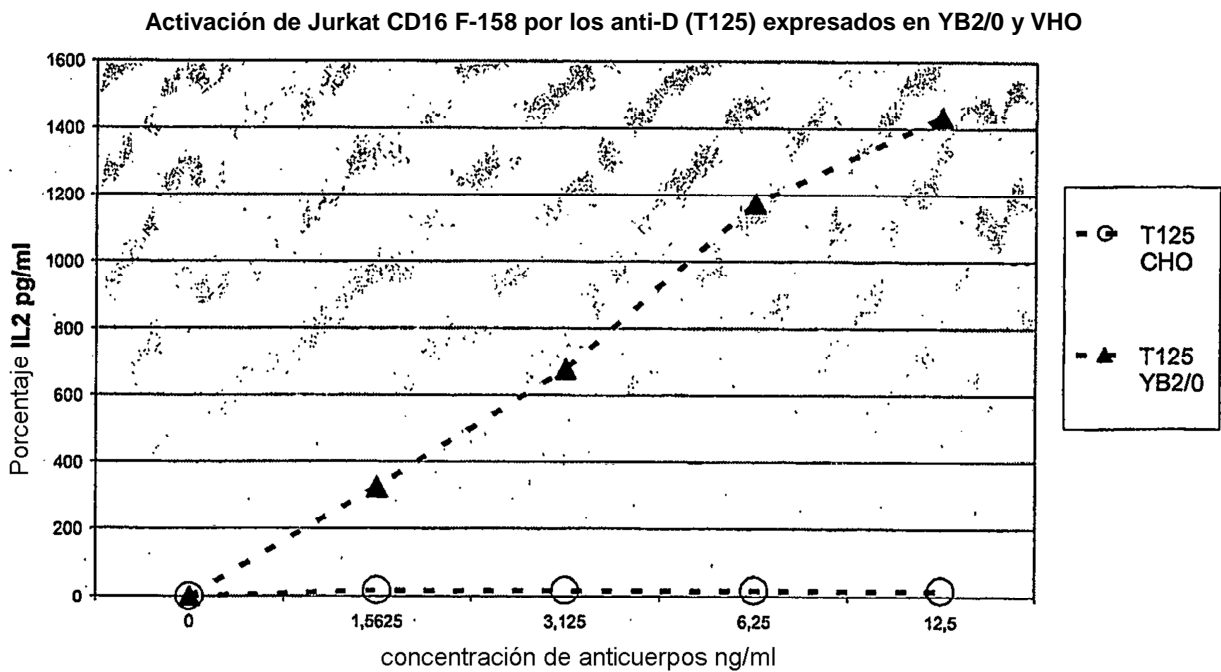


Figura 2



**Figura 3**



**Figura 4**

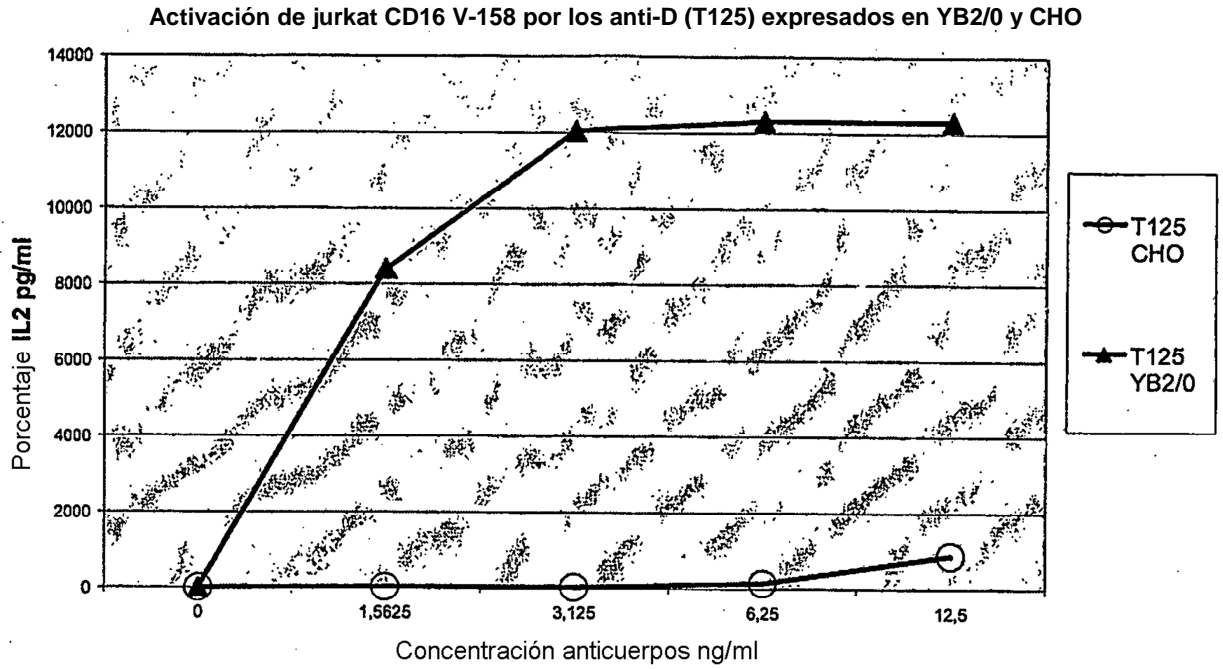


Figura 5

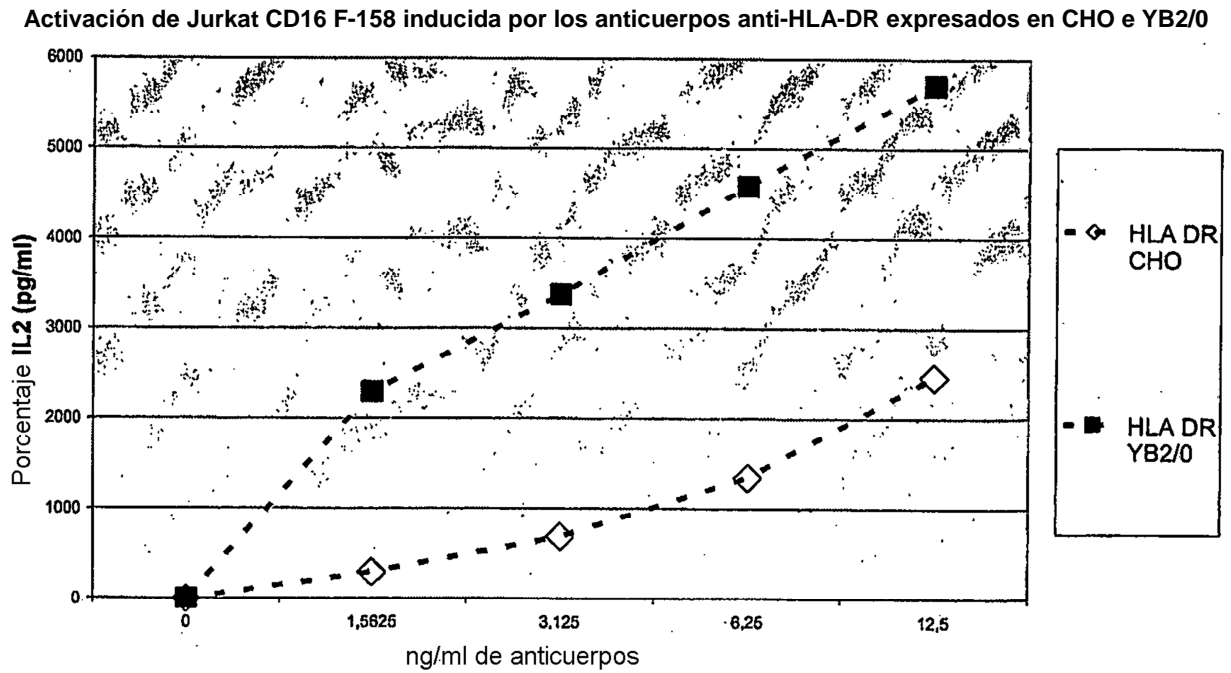


Figura 6



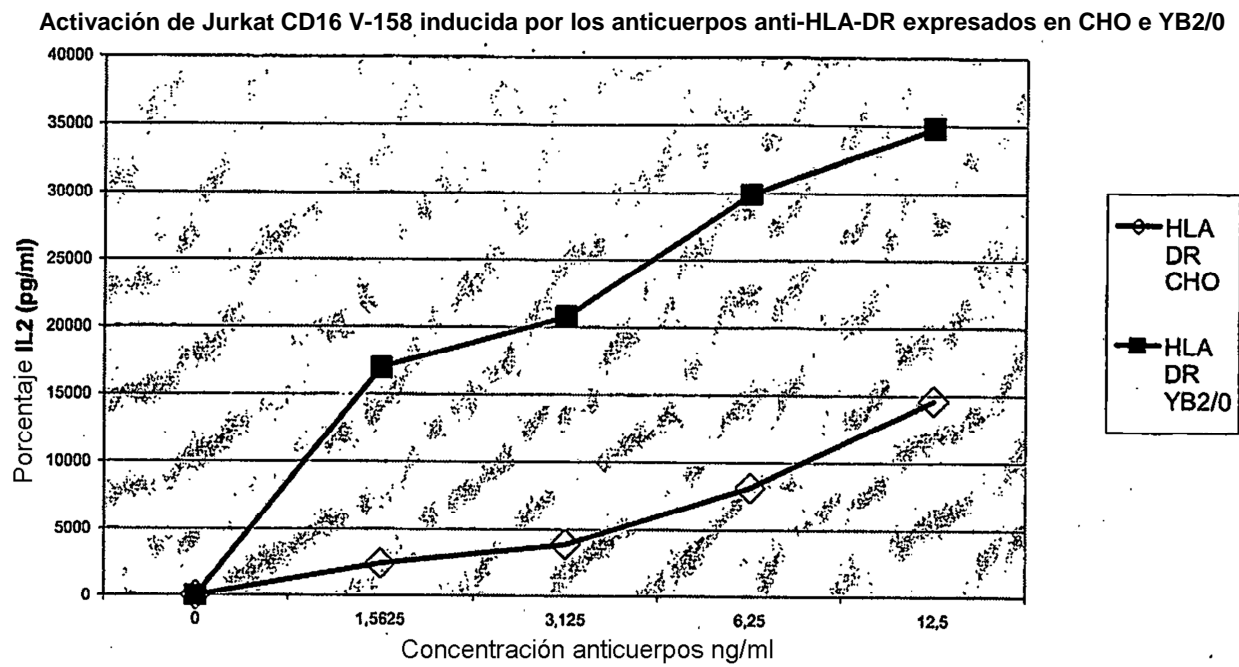


Figura 7