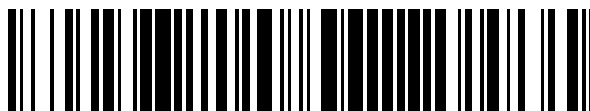


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 937**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2009** **PCT/US2009/038201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009** **WO09123894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009** **E 09727180 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 2247304**

54 Título: **Anticuerpos específicos para HER2/neu y métodos para utilizar los mismos**

30 Prioridad:

02.04.2008 US 41649 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2016

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S.;
HUANG, LING;
TUAILLON, NADINE y
BONVINI, EZIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 587 937 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos para HER2/neu y métodos para utilizar los mismos

Referencia a Listas de Secuencias:

- 5 Esta solicitud incluye una o más Listas de Secuencias de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, que se describen tanto en medios impresos como en medios legibles por ordenador y cuyas descripciones impresas y legibles por ordenador se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Antecedentes de la Invención:**Campo de la Invención:**

- 10 Esta invención se relaciona con nuevos anticuerpos 4D5 que se unen específicamente con HER2/neu y, de manera particular, con nuevos anticuerpos 4D5 quiméricos para HER2/neu, que tienen glicosilación reducida y funciones efectoras alteradas en comparación con anticuerpos 4D5 conocidos. La descripción también se relaciona con métodos para utilizar los anticuerpos y composiciones que los comprenden en el diagnóstico, pronóstico y terapia de enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. La invención proporciona el uso de los anticuerpos para la fabricación de un medicamento para el
- 15 tratamiento de cáncer que expresa HER2/neu.

Descripción de la Técnica Relacionada:**Receptores HER2/neu y HER2/neu**

- 20 Los procesos de crecimiento y diferenciación celular implican factores de crecimiento que ejercen sus acciones a través de receptores específicos tales como las tirosinas quinasas. La unión del ligando con un receptor de tirosina quinasa desencadena una cascada de acontecimientos que finalmente producen la proliferación y diferenciación celular. (Carpenter *et al.* (1979) *Biochem.* 48:193-216; Sachs *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:1981-8196). Los receptores de tirosina quinasa pueden clasificarse en varios grupos con base en la similitud de las secuencias y características definidas. Una de estas familias es la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico o ErbB, que incluye múltiples receptores conocidos como HER-1 (también conocido como erbB-1 o EGFR), HER-2 o
- 25 HER2/neu (también conocido como erbB-2, c-neu, o p185), HER-3 (también conocido como erbB-3) y HER-4 (también conocido como erbB-4). (Véase, por ejemplo, Carpenter *et al.*, mencionado anteriormente; Semba *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82: 6497-6501; Coussens *et al.* (1985) *Science*, 230:1130-1139, Bargmann *et al.* (1986) *Cell* 45:649-657; Kraus *et al.* (1989) *PNAS* 86: 9193-9197; Carraway *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:14303-14306; y Plowman *et al.* (1993) *Nature* 366: 473-475; Tzahar *et al.* (1994) *Biol. Chem.* 269: 25226-25233).
- 30

- Los receptores ErbB desempeñan papeles importantes en la propagación de señales que regulan la proliferación, diferenciación, motilidad y apoptosis celular, tanto en procesos de desarrollo normales como en tumorigénesis humana. (Slamon *et al.* (1989) *Science* 244:707-712). Por ejemplo, la activación de receptores erbB se acopla con y estimula las rutas de crecimiento y supervivencia de MAPK-Erk1/2 y fosfoinositida-3-quinasa (PI₃K)/AKT corriente
- 35 abajo. La falta de regulación de estas rutas en el cáncer se ha relacionado con avance de la enfermedad y resistencia a la terapia. (Fukazawa *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:14554-14559; Tzahar *et al.* (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16:5276-5287; Lange *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:31308-31316; Olayioye *et al.* (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18:5042-5051; Hackel *et al.* (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:184-189). La activación de PI₃K/AKT fomenta supervivencia celular y malignidad tumoral potenciada y se informó que AKT2 se activa y expresa en exceso en cánceres de mama que expresan HER2/neu en exceso. (Shak (1999) *Semin. Oncol. Supl* 12:71-77; Huang *et al.* (2000) *Clinical Cancer Res.* 7:2166-2174; Bacus *et al.* (2002) *Oncogene* 21:3532-3540).
- 40

- La señalización mediante la familia de receptores ErbB inicia mediante unión de ligandos que desencadena dimerización de homo o hetero-receptores, fosforilación recíproca de tirosina de las colas citoplasmáticas, y activación de rutas de transducción de señalización intracelular. (Citri *et al.* (2003) *Exp. Cell Res.* 284:54). La disponibilidad de los ligandos que se unen con y activan los receptores ErbB está mediada por diversas metaloproteasas, tales como la familia de ADAM (A Desintegrina y Metaloproteasa) de metaloproteasas dependientes de zinc, que catalizan el desprendimiento en el ectodominio en la superficie celular de proteínas específicas. (Véase Chang y Werb (2001) *Trends in Cell Biology* 11:537-543; Moss y Lambert (2002) *Essays in Biochemistry* 38:141-153; Seals y Courtneidge (2003) *Genes and Development* 17:7-30). Específicamente, la familia
- 45 de ADAM ha demostrado dividir los ligandos responsables de activar los receptores ErbB, tales como APP y Notch. (Blöbel (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:32-43).
- 50

- Un miembro importante de la familia ErbB, HER2/neu, es una proteína receptora de 185 kDa que se identificó en un principio como el producto del gen de transformación de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. El HER2/neu se ha investigado de manera exhaustiva debido a su función en varios carcinomas humanos y en el
- 55 desarrollo de los mamíferos. (Hynes y Stern (1994) *Biochim. et Biophys. Acta* 1198:165-184; y Dougall *et al.* (1994) *Oncogene* 9:2109-2123; Lee *et al.* (1995) *Nature* 378:394-398). El gen de HER2/neu humano y la proteína

HER2/neu se describen en Semba *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:6497-6501 y Yamamoto *et al.* (1986) Nature 319:230-234, y la secuencia está disponible en el GenBank con el número de registro X03363. El HER2/neu comprende cuatro dominios: un dominio extracelular con el que se unen los ligandos; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización en el carboxilo terminal que alberga varios residuos de tirosina que pueden fosforilarse. (Plowman *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1746-1750). La secuencia del dominio extracelular (ECD) de HER2/neu se describió por Franklin *et al.* (2004) Cancer Cell. 5(4):317-328, y se encuentra disponible en el Protein DataBank registro 1S78 (2004).

El HER2/neu funciona como un receptor del factor de crecimiento y a menudo se expresa en tumores tales como cáncer de mama, cáncer ovárico y cáncer de pulmón. El HER2/neu se expresa en exceso en 25-30 % de los cánceres humanos de mama y ovarios y se asocia con el avance clínico de la malignidad y pronóstico desalentador para estos pacientes. (Slamon *et al.* (1987) Science 235:177-182; Slamon *et al.* (1989) Science 244:707-712). La expresión en exceso de HER2/neu también se ha observado en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. (Véase, por ejemplo, King *et al.* (1985) Science 229:974; McCann *et al.* (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura *et al.* (1991) Cancer Research 51:1034).

La activación de HER2/neu se ha correlacionado con respuesta clínica reducida a la terapia hormonal en pacientes con cáncer de mama. (Wright *et al.* (1989) Cancer Res. 49:2087-2090; Kurokawa & Arteaga (2001) Clin. Cancer Res. 7:4436s-42s, 4411s-4412s). En efecto, la expresión de HER2/neu es suficiente para provocar resistencia anti-estrógenos. (Benz *et al.* (1993) Breast Cancer Res. Treat. 24:85-95). El HER2/neu, así como el HER-3, también parece estar involucrado en la aparición de resistencia hormonal en pacientes con cáncer de próstata. Aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer de próstata reciben tratamiento de terapia hormonal dirigida a interrumpir la acción de andrógenos testiculares y suprarrenales. Como con el cáncer de mama, la resistencia es inevitable. Datos recientes sugieren que las señales que emanan de HER2/neu y HER-3 inducen un estado "resistente a las hormonas". (Mellinghoff *et al.* (2004) Cancer Cell 6:517-527).

Se conocen varias versiones truncadas y divididas de HER2/neu. Por ejemplo, un ECD truncado ubicado en el citoplasma perinuclear de algunas células de carcinomas gástricos se produce por un transcrito alternativo generado por el uso de una señal de poliadenilación dentro de un intrón. (Yamamoto *et al.* (1986) Nature 319:230-234; y Scott *et al.* (1993) Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257). No se ha atribuido ningún uso terapéutico, diagnóstico o de investigación particular para este polipéptido ECD truncado. El ECD de HER2/neu también puede diseminarse de manera proteolítica a partir de las células de carcinoma de mama en cultivo y se encuentra en el suero de algunos pacientes con cáncer cuando este puede ser un indicador en suero de cáncer metastásico de mama y pronóstico desalentador general. (Petch *et al.* (1990) Mol. Cell. Biol. 10:2973- 2982; Leitzel *et al.* (1992) J. Clin. Oncol. 10:1436-1443; Scott *et al.* (1993) Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257; y Lee y Maihle (1998) Oncogene 16:3243-3252). En algunas células tumorales que expresan HER2/neu en exceso, acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA), un activador de metaloproteasa bien conocido activa metaloproteasas tales como ADAM10 y ADAM15 para dividir el receptor HER2/neu en dos partes: un receptor truncado asociado con membranas conocido como p95, y un ECD soluble conocido como p105 o ECD105. (Véase, por ejemplo, Molina *et al.* (2001) Cancer Res. 61:4744-4749; la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2004/0247602). La pérdida de ECD convierte al receptor p95 en una tirosina quinasa constitutivamente activa, que puede liberar señales de crecimiento y supervivencia a las células cancerígenas. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.541.214).

Estudios han demostrado que en células de cáncer de mama que expresan HER2/neu en exceso, el tratamiento con anticuerpos específicos para HER2/neu en combinación con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxoubicina, taxol) produce una respuesta citotóxica más elevada que el tratamiento con quimioterapia únicamente. (Hancock *et al.* (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga *et al.* (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras *et al.* (1994) Oncogene 9:1829-1838). Un posible mecanismo por medio del cual los anticuerpos de HER2/neu pueden mejorar la respuesta a agentes quimioterapéuticos es a través de la modulación de la expresión de la proteína HER2/neu o al interferir con la restauración de ADN. (Stancovski *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus *et al.* (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus *et al.* (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper *et al.* (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper *et al.* (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga *et al.* (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s).

Se ha desarrollado una serie de anticuerpos monoclonales y pequeños inhibidores moleculares de tirosina quinasa dirigidos a HER-1 o HER2/neu. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino conocido como 4D5 reconoce un epítipo extracelular (aminoácidos 529 a 627) en el II dominio rico en cisteína de HER2/neu que está muy cerca de la región transmembrana. El tratamiento de células de cáncer de mama con 4D5 bloquea de forma parcial la activación de NDF/herregulina de complejos de HER2/neu-HER-3, según se determina mediante ensayos de fosforilación de receptores. (Carter *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; Sliwkowski *et al.* (1999) Sem. in Oncol. 26:60-70; Ye *et al.* (1999) Oncogene 18:731-738; Vogel *et al.* (2001) Oncology 61(sup. 2):37-42; Vogel *et al.* (2002) Journal of Clinical Oncology 20(3):719-726; Fujimoto-Ouchi *et al.* (2002) Cancer Chemother. Pharmacol. 49:211-216). Sin embargo, la administración de 4D5 en seres humanos, fue un fracaso clínico, debido a que los pacientes desarrollaban respuestas HAMA con rapidez, de modo que se desarrollaron formas humanizadas. La secuencia y estructura cristalina del anticuerpo 4D5 humanizado se han descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 6.054.297,

Carter *et al.*, mencionado anteriormente, y Eigenbrot *et al.* (1993) J. Mol. Biol. 229:969-95.

Una forma humanizada de 4D5 conocida como trastuzumab (comercializado como Herceptin® por Genentech, Inc.) fue desarrollada y aprobada para tratar cánceres relacionados con la expresión en exceso o amplificación genética de HER2/neu, que incluyen el cáncer de mama. (Cobleigh *et al.* (1999) J. Clin. Oncol. 17:2639-2648). El trastuzumab inhibe la división mediada por APMA de HER2/neu en las porciones ECD y p95 *in vitro* y se cree que funciona *in vitro* a través de diferentes mecanismos, que incluyen la posible inhibición de la diseminación de HER2/neu. (Pegram *et al.* (1998) Journal of Clinical Oncology 16(8):2659-2671; Baselga *et al.* (2001) Seminars in Oncology 28(5) (sup. 16):4-11; Baselga *et al.* (2001) Annals of Oncology 12 (sup. 1):S35-S41). Sin embargo, la terapia con trastuzumab tiene diversas desventajas, tales como cardiotoxicidad y desarrollo de respuestas HAMA en algunos pacientes.

Por lo tanto, aún existe la necesidad de formas nuevas o mejoradas de anticuerpos HER2/neu para su uso en terapias anti-cáncer, por ejemplo, anticuerpos 4D5 que tienen afinidad o especificidad en aumento, potencial reducido para HAMA o respuestas HAMA, funciones efectoras alteradas y similares.

Receptores de Fc

La interacción de complejos de antígenos/anticuerpos con células del sistema inmunitario tiene como consecuencia una gran variedad de respuestas, que van de funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis hasta señales inmunomoduladoras tales como la regulación de proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión del dominio de Fc de anticuerpos o complejos inmunitarios con los receptores de Fc, que son receptores especializados de la superficie celular de células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión de ligandos relacionados estructuralmente que quizá intervengan en la señalización intracelular.

Los receptores de Fc, miembros de la superfamilia de los genes de inmunoglobulina de las proteínas, son glicoproteínas superficiales que se unen con la porción de Fc de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce las inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor de Fc. Los receptores de Fc se definen por su especificidad para subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fc para IgG se denominan "Fc γ R," para IgE como "Fc ϵ R," y para IgA como "Fc α R." Diferentes células auxiliares transportan receptores de Fc para anticuerpos de isotipo diferente y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares se utilizarán en una respuesta específica (Billadeau *et al.* (2002) J. Clin. Investigat. 2(109):161-81; Gerber *et al.* (2001) Microbes Infection 3:131-139; Ravetch *et al.* (2001) Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch *et al.* (2000) Science 290:84-89; Ravetch (1994) Cell 78(4):553-560; Ravetch *et al.* (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492; véase también, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (4a ed. 1999), Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York). Se presenta una visión de conjunto de diversos receptores en la **Tabla 1**.

TABLA 1			
Receptores para las Regiones de Fc de Isotipos de Inmunoglobulinas			
Receptor	Unión	Tipo Celular	Efecto de la Unión
Fc γ RI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	Macrófagos	Captación
		Neutrófilos	Estimulación
		Eosinófilos	Activación de estallido respiratorio
		Células dendríticas	Inducción de eliminación
Fc γ RII-A (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Macrófagos	Captación
		Neutrófilos	Liberación granular
		Eosinófilos	
		Células dendríticas	
		Plaquetas	
		Células de Langerhan	

FcγRII-B1 (CD32)	IgG1	Linfocitos B	Sin Captación
	$2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Mastocitos	Inhibición de Estimulación
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	Macrófagos	Captación
		Neutrófilos	Inhibición de Estimulación
		Eosinófilos	
FcγRIII (CD 16)	IgG1 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	Células NK	Inducción de eliminación
		Eosinófilos	
		Macrófagos	
		Neutrófilos	
		Mastocitos	
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	Mastocitos	Secreción de gránulos
		Eosinófilos	
		Basófilos	
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Macrófagos	Captación
		Neutrófilos	Inducción de eliminación
		Eosinófilos	

Cada receptor de Fcγ ("FcγR") es una glicoproteína de membrana integral, que tiene dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un único dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen cuatro FcγR conocidos, denominados FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD 16) y FcγRIV. Los receptores se codifican por distintos genes; sin embargo, la amplia homología entre los miembros de esta familia sugiere que surgen de un progenitor común, quizá mediante duplicación genética.

Tanto las señales de activación como las inhibitoras se transducen a través del FcγRs después de la unión. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios distintos dentro de los dominios citoplasmáticos de señalización del receptor denominados motivos de activación de inmunorreceptores a base de tirosina (ITAMs) o motivos inhibitoras de inmunorreceptores a base de tirosina (ITIMS) son responsables por las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras determina el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA y FcγRIV, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB.

El FcγRI muestra alta afinidad para la región constante del anticuerpo y especificidad restringida para los isotipos (Hulett y Hogarth (1994) Adv Immunol 57:1-127). Las proteínas FcγRII son glicoproteínas de membrana integrales de 40 KDa que solo se unen con IgG compleja debido a una baja afinidad con la Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el más expresado en FcγR, está presente en todas las células hematopoyéticas, que incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. El FcγRII solo tiene dos regiones similares a inmunoglobulina en su cadena de unión con inmunoglobulina y, por lo tanto, una afinidad mucho menor para IgG que el FcγRI. Existen tres genes de FcγRII humanos conocidos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales se unen con IgG en agregados o complejos inmunitarios. Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. El gen de FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96 % idéntico a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de manera imperceptible.

Diferencias definidas dentro de los dominios citoplasmáticos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas para la unión de receptores. La isoforma FcγRII-A inicia la señalización intracelular que produce la activación celular, tal como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras que la isoforma FcγRII-B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibe la activación de linfocitos B. El agrupamiento de FcγRIIA mediante complejos inmunitarios o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAMs junto con quinasas asociadas con receptores, lo que facilita la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la Syk quinasa, cuya activación tiene como consecuencia la activación de sustratos corriente

abajo (por ejemplo, PI3K). La activación celular produce la liberación de mediadores proinflamatorios. Cuando se co-unen o co-agregan junto con un Fc γ R activador que tiene un ITAM, tal como Fc γ RIIA o Fc ϵ RI, el ITIM en Fc γ RIIB sufre fosforilación y atrae al dominio SH2 de fosfatasa de inositol que contiene la homología src 2 (SHIP) que, a su vez, se fosforila y asocia con Shc (Ott (2002) *J. Immunol.* 162(9):4430-4439; Yamanshi *et al.* (1997) *Cell* 88:205; Carpino *et al.* (1997) *Cell* 88:197). La SHIP hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por Fc γ R que contiene ITAM, con lo que se impide la afluencia de Ca⁺⁺ intracelular y se mitiga la capacidad de respuesta celular a la unión de Fc γ R. Por lo tanto, se cancela la activación de linfocitos B, proliferación de linfocitos B y secreción de anticuerpos y disminuye la fagocitosis mediada por Fc γ R (Tridandapani *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277(7):5082-89).

Específicamente, la co-agregación de Fc γ RIIA con Fc γ RIIB tiene como consecuencia la regulación negativa de fosforilación de Akt, que es una serina-treonina quinasa involucrada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis y la co-agregación de Fc γ RIIB con el receptor de Fc ϵ RI de IgE de alta afinidad en mastocitos produce la inhibición de la desgranulación inducida por antígenos, movilización de calcio y producción de citoquinas (Long (1999) *Annu Rev. Immunol.* 17:875; Metcalfe *et al.* (1997) *Physiol. Rev.* 77:1033). La co-agregación de Fc γ RIIB y el receptor de linfocitos B (BCR) produce la inhibición de la señalización mediada por BCR y la inhibición de avance del ciclo celular y supervivencia celular. Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por Fc γ RIIB de la señalización de BCR están mediadas por SHIP, recientemente se ha demostrado que los linfocitos B activados por lipopolisacáridos (LPS) provenientes de ratones con deficiencia de SHIP muestra una significativa inhibición mediada por Fc γ RIIB de movilización de calcio, producción de Ins(1,4,5)P₃, y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al.* (2001) *Journal of Immunology* 167(1): 204-211).

La dimensión de Fc γ RIII oscila entre 40 y 80 kDa en ratones y humanos, debido a la heterogeneidad dentro de esta clase. Dos genes humanos codifican dos transcritos, Fc γ RIIIA, una glicoproteína de membrana integral y Fc γ RIIIB, una versión ligada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen de murino codifica un Fc γ RIII homologa al Fc γ RIIIA humano transmembrana. El Fc γ RIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos Fc γ Rs. Como Fc γ RII, Fc γ RIII se une con IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios similares a Ig extracelulares correspondientes. Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y es el Fc γ R aislado en células NK. En la actualidad, se sabe que el Fc γ RIIIB ligado a GPI se expresa solo en neutrófilos humanos.

Fc γ RIV (también conocido como mFcRIV) requiere la asociación de la cadena FcR gama para la expresión y función óptima en células mieloides, su potencial de señalización también mejora mediante un motivo citoplasmático "YEEP" que atrae la molécula adaptadora Crk-L y fosfatidilinositol-3-OH quinasa. El Fc γ RIV se une preferentemente con anticuerpos de inmunoglobulina E del alotipo b (IgEb) así como con anticuerpos de IgG2a e IgG2b. La unión de Fc γ RIV mediante complejos inmunitarios antígeno-IgEb fomenta la fagocitosis mediada por macrófagos, la presentación de antígenos a linfocitos T, producción de citoquinas proinflamatorias y la fase tardía de las reacciones alérgicas cutáneas (Hirano *et al.* (2007) *Nature Immunology* 8:762-771). Fc γ RIV es un receptor identificado de manera reciente, conservado en todas las especies de mamíferos con afinidad mediadora y especificidad restringida de subclases (Nimmerjahn *et al.* (2005) *Immunity* 23:41-51; Mechetina *et al.* (2002) *Immunogenetics* 54:463-468; Davis *et al.* (2002) *Immunol Rev* 190:23-36). El FcRIII y FcRIV son FcRs importantes para la activación a nivel fisiológico para intervenir en las enfermedades inflamatorias desencadenadas por anticuerpos citotóxicos o complejos inmunitarios patogénicos. El FcRIV se encuentra en células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos.

El documento WO 2007/106707 describe la modificación técnica de anticuerpos con cadenas pesadas variantes, en particular cadenas pesadas variantes que comprenden dominios de dos o más subclases de IgG diferentes. Por ejemplo, el documento describe anticuerpos que comprenden dominios CH1, bisagra y amino terminal superior de IgG1 combinados con el resto de la región Fc de IgG2. También se analizan otras combinaciones de dominios constantes de IgG. Adicionalmente el documento identifica un gran número de alteraciones en la secuencia de Fc dirigidas a modificar la función efectora de anticuerpos que contienen las alteraciones.

El documento US 2006134709 también describe la modificación técnica de la región Fc de anticuerpos para conferir función efectora. Se proporcionan diversas alteraciones que proporcionan, por ejemplo, función ADCC potenciada. En algunos casos, los anticuerpos que contienen las alteraciones se unen con FcgammaRIIIA y/o FcgammaRIIA con mayor afinidad en relación con una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo silvestre.

A pesar de tales avances, aún existe la necesidad de desarrollar anticuerpos anti-HER2/neu que tengan un uso terapéutico en el tratamiento de autoinmunidad, cáncer, enfermedades inflamatorias y/o trasplantes, y que muestre la capacidad mejorada de intervenir en la función efectora de los receptores de Fc. La presente invención se enfoca en esta y otras necesidades.

Compendio de la Invención:

Las realizaciones de la invención proporcionan diversos anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 4** y un anticuerpo que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos comprenden además una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 9**, la **SEQ ID NO: 11**, y la **SEQ ID NO: 13**.

5 Los anticuerpos se unen de manera específica con HER2/neu humano. Los anticuerpos comprenden un dominio de Fc variante, que comprende modificaciones, lo que confiere una alteración de fenotipos en el polipéptido o anticuerpo, que incluye una función efectora alterada, una unión aumentada o disminuida con un Fc γ R, etc. También se describen polinucleótidos que codifican los anticuerpos, vectores que comprenden los polinucleótidos, y células hospedadoras que comprenden los vectores. También se proporcionan métodos para producir los polipéptidos y anticuerpos, así como métodos para tratar diversas enfermedades y trastornos.

10 En detalle, la invención proporciona un polipéptido que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina 4D5 quimérica que comprende una sustitución N65S, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 4** o la **SEQ ID NO: 2**.

15 En particular, la invención se relaciona con un anticuerpo que comprende un dominio de Fc variante que tiene modificaciones en el dominio de Fc. En particular, la invención se relaciona con realizaciones en las que la modificación comprende sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

La invención proporciona anticuerpos en donde la modificación en el dominio de Fc comprende:

(1) F243L, R292P e Y300L;

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L; o

20 (3) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

La invención tiene que ver, además, con realizaciones de tales anticuerpos en donde el dominio de Fc variante muestra, en comparación con dominio de Fc natural:

(A) citotoxicidad mejorada mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC);

(B) unión aumentada con Fc γ RIIA o con Fc γ RIIIA;

25 (C) unión reducida con Fc γ RIIB; o

(D) unión aumentada con Fc γ RIIB.

30 La invención se relaciona, además, con las realizaciones de los anticuerpos descritos en lo anterior en donde la cadena ligera de inmunoglobulina comprende un dominio variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 4** y la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 9**, la **SEQ ID NO: 11** o la **SEQ ID NO: 13**.

La invención se relaciona, además, con las realizaciones de los anticuerpos descritos en lo anterior en donde el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo monoclonal o un diacuerpo.

La invención se relaciona, además, con el uso de los anticuerpos descritos en lo anterior en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer que expresa HER2/neu en un paciente.

35 La descripción se relaciona, además, con un método para tratar cáncer que comprende proporcionar a un paciente que necesite el mismo una cantidad efectiva de los anticuerpos descritos en lo anterior y, en particular, en donde el cáncer es un cáncer que expresa HER2/neu y en donde el anticuerpo se une con HER2/neu humano.

40 La invención se relaciona, además, con el uso de tales anticuerpos, en donde el tratamiento comprende, además, la etapa de administrar un segundo agente terapéutico de manera simultánea o secuencial con el anticuerpo, en donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente anti-angiogénico, un agente anti-neoplásico, un agente quimioterapéutico, y un agente citotóxico.

Las ventajas y características adicionales de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y ejemplos, que ilustran las realizaciones preferidas de la invención.

Breve Descripción de los Dibujos:

45 La **Figura 1** representa una alineación de secuencias que compara las secuencias de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo 4D5 quimérico de una realización preferida (**SEQ ID NO: 4**) con anticuerpos 4D5 murinos (**SEQ ID NO: 3**) y humanizados (**SEQ ID NO: 5**).

La **Figura 2** representa una comparación entre las secuencias de las cadenas pesadas de Fc natural ("WT") ch4D5

(SEQ ID NO: 7), ch4D5-FcMT1 ("MT1") (SEQ ID NO: 9), ch4D5-FcMT2 ("MT2") (SEQ ID NO: 11) y ch4D5-FcMT3 ("MT3") (SEQ ID NO: 13). Las CDR se indican con barras negras mostradas por debajo de los residuos pertinentes.

La **Figura 3** representa un análisis BIACore de la unión de Fc natural ch4D5 (panel A), ch4D5 (panel B) y trastuzumab (panel C).

5 La **Figura 4** representa el efecto de ch4D5 en la proliferación de células SKBR3 *in vitro*.

La **Figura 5** representa la actividad anti-tumoral mejorada de diversos anticuerpos de las presentes realizaciones en ratones no transgénicos.

La **Figura 6** representa la actividad anti-tumoral mejorada de diversos anticuerpos de las presentes realizaciones en ratones transgénicos hCD16A.

10 La **Figura 7** representa el papel de mFcRIV y hCD16A en la inhibición del crecimiento tumoral a través de varios anticuerpos de las presentes realizaciones en ratones no transgénicos y transgénicos.

La **Figura 8** representa la actividad anti-tumoral mejorada de diversos anticuerpos de las presentes realizaciones en ratones transgénicos hCD16A.

15 La **Figura 9** ilustra la tinción inmunohistoquímica representativa de células de diversas líneas celulares cancerosas para HER2/neu. Los diversos paneles representan las diferentes líneas celulares, es decir, Panel A: MDA-MB-435; Panel B: MDA-MB-231; Panel C: A549; Panel D: OVCAR-8; Panel E: MCF-7; Panel F: BT-20; Panel G: HT-29; Panel H: ZR75-1; Panel I: JIMT-1; Panel J: MDA-MB-453; Panel K: BT-474; Panel L: SKBR-3; y Panel M: mSKOV-3.

20 La **Figura 10** representa los resultados de ensayos de ADCC realizados para poner a prueba la capacidad de diversos anticuerpos ch4D5 de las presentes realizaciones para intervenir en ADCC en líneas celulares cancerosas (MDA-MB-435 en el Panel A; MDA-MB-231 en el Panel B) que tienen niveles muy bajos o nulos de expresión de HER2/neu (puntuación DAKO de 0).

25 La **Figura 11** representa los resultados de los ensayos de ADCC realizados para poner a prueba la capacidad de diversos anticuerpos ch4D5 de las presentes realizaciones para intervenir en ADCC en líneas celulares cancerosas (A549 en el Panel A; OVCAR-8 en el Panel B; MCF-7 en el Panel C; BT-20 en el Panel D; HT-29 en el Panel E) que tienen niveles de expresión bajos de HER2/neu (puntuación DAKO de 1+).

La **Figura 12** representa los resultados de los ensayos de ADCC realizados para poner a prueba la capacidad de diversos anticuerpos ch4D5 de las presentes realizaciones para intervenir en ADCC en líneas celulares cancerosas (ZR75-1 en el Panel A; JIMT-1 en el Panel B) que tienen niveles moderados de expresión de HER2/neu (puntuación DAKO de 2+).

30 La **Figura 13** representa los resultados de los ensayos de ADCC realizados para poner a prueba la capacidad de diversos anticuerpos ch4D5 de las presentes realizaciones para intervenir en ADCC en líneas celulares cancerosas (MDA-MB-453 en el Panel A; BT-474 en el Panel B; SKBR-3 en el Panel C; mSKOV-3 en el Panel D) que tienen niveles de expresión elevados de HER2/neu (puntuación DAKO de 3+).

Descripción Detallada de la Invención:

35 La presente invención proporciona nuevos anticuerpos y métodos para tratar, diagnosticar y pronosticar ciertos cánceres utilizando anticuerpos contra HER2/neu. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos anti-HER2/neu que son particularmente útiles como agentes citotóxicos selectivos para células que sobreexpresan HER2/neu, es decir, anticuerpos 4D5 quiméricos para HER2/neu, que tienen glicosilación reducida o funciones efectoras alteradas en comparación con anticuerpos 4D5 conocidos. También se describen métodos para utilizar los anticuerpos y composiciones que los comprenden en el diagnóstico, pronóstico y terapia de enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas.

45 Ahora, se hará referencia con detalle a las realizaciones preferidas en este momento de la invención, que, junto con los dibujos y los siguientes ejemplos, sirven para explicar los principios de la invención. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir que los expertos en la técnica practiquen la invención y debe entenderse que es posible utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios estructurales, biológicos y químicos sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención. A menos que se indique de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente comprenden los expertos habituales en la técnica a la que pertenece esta invención. Una persona con experiencia en la técnica puede recurrir a textos de referencia general para tales definiciones o descripciones detalladas de técnicas mencionadas en la presente memoria. Estos textos incluyen, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al*, eds., John Wiley & Sons, y suplementos hasta marzo de 2008), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook y Russell, 3ª edición, 2001); Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual (Selvin & Ha, eds., Cold Spring Harbor Press, 2008); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (Beaucage *et al*, eds., John Wiley & Sons, Inc., 2000); Current Protocols in Immunology (Coligan *et al*, eds., John Wiley & Sons, N. Y.,

- y suplementos hasta marzo del 2008), Making and Using Antibodies: A Practical Handbook (Howard & Kaser, eds., CRC, 2006); Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow & Lane, Cold Spring Harbor Press, 1999); Binding and Kinetics for Molecular Biologists (Goodrich & Kugel, Cold Spring Harbor Press, 2007); Current Protocols in Pharmacology (Enna *et al.*, eds., John Wiley & Sons, N. Y., y suplementos hasta marzo del 2008), The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman & Gilman, 11ª edición, 2006), y Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins, 21ª edición (2005).

A. Definiciones

- Como se utiliza en la presente memoria, el término “ADCC” se refiere a Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos, una reacción mediada por células *in vitro* en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs (por ejemplo, células monocíticas tales como Linfocitos Citolíticos Naturales (NK) y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y después provocan la lisis de la célula objetivo.

- Como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de camélido, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos capaces de unirse con un epítipo, por ejemplo, fragmentos de Fab, fragmentos de Fab', Fragmentos de F(ab')₂, fragmentos de Fv, fragmentos que contienen ya sea un dominio de VL o VH o una región determinante de complementariedad (CDR) que se une de manera inmuno-específica con un antígeno, etc.), anticuerpos bi-funcionales o multi-funcionales, Fvs biespecíficos ligados a disulfuro (sdFv), intracuerpos y diacuerpos, y fragmentos de unión con epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, el término anticuerpos pretende abarcar moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión con antígenos. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase (véase, por ejemplo, Las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º: 20040185045; 20050037000; 20050064514; 20050215767; 20070004909; 20070036799; 20070077246; y 20070244303).

- La referencia a un “receptor de antígenos de linfocitos B” o “BCR” pretende hacer referencia al receptor de antígenos de linfocitos B, que incluye un componente de unión con antígenos de inmunoglobulina de membrana (mlg), o una porción biológicamente activa del mismo (es decir, una porción capaz de unirse con un ligando y/o capaz de asociarse con un componente transductor) y un transductor CD79a y componentes CD79b o porciones biológicamente activas de los mismos (es decir, una porción capaz de transducir una señal intracelular y/o capaz de asociarse con una porción de unión con ligando extracelular).

- Como se utiliza en la presente memoria, el término “cáncer” se refiere a un neoplasma o tumor consecuencia de un crecimiento anómalo no controlado de células. Como se utiliza en la presente memoria, cáncer incluye de manera explícita leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que sigue localizado. En otras realizaciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales circundantes y se ha expandido a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno de cáncer específico.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos asociados en cierto grado con proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

- El término “quimérico”, cuando se refiere a anticuerpos, se refiere a un anticuerpo en el que una porción de una cadena pesada y/o ligera es idéntica u homologa a un anticuerpo de una especie (por ejemplo, ratón) o clase o subclase de anticuerpos, mientras que la porción restante es idéntica u homologa a un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, humano) o clase o subclase de anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígenos de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Cercopitécidos, simios, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “Región Determinante de Complementariedad” o “CDR” se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpos que es necesario para la unión con antígenos. Cada dominio variable por lo general tiene tres regiones CDR identificadas como CDR₁, CDR₂ y CDR₃.

- Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “molécula de diacuerpo” se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, comprendiendo cada una por lo menos un dominio V_L y un dominio V_H o fragmento del mismo, en donde ambos dominios están comprendidos dentro de una sola cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones, una “molécula de diacuerpo” incluye moléculas que comprenden un dominio de Fc o un dominio de Fc en bisagra. Tales cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homo-multímero o un hetero-multímero. En aspectos específicos, una “molécula de diacuerpo” incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio V_L como un dominio V_H. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden unirse de manera covalente con por lo menos otro péptido del multímero mediante puentes de disulfuro

intercatenarios.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “trastorno” y “enfermedad” se utilizan de manera indistinta para referirse a una afección en un sujeto. En particular, la expresión “enfermedad autoinmunitaria” se utiliza de manera indistinta con la expresión “trastorno autoinmunitario” para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto hacia sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión “enfermedad inflamatoria” se utiliza de manera indistinta con la expresión “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden o no estar asociados con inflamación. Además, la inflamación puede o no ser causada por un trastorno autoinmunitario. Por lo tanto, ciertos trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunitarios como inflamatorios.

La expresión “célula efectora” como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc e interviene en una o más de las funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero sin limitación monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos granulares grandes, Células de Langerhans, linfocitos citotóxicos naturales (NK), y pueden provenir de cualquier organismo que incluye pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos.

La expresión “célula efectora” se refiere a actividades biológicas atribuibles a la interacción de una región de Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o ligando. Un anticuerpo puede tener una o más funciones efectoras. Ejemplos no limitantes de funciones efectoras de anticuerpos incluyen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), Unión de C1q, citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), opsonización, opsonofagocitosis, unión celular y formación de rosetas. Las funciones efectoras incluyen tanto aquellas que operan después de la unión de un antígeno como aquellas que operan de manera independiente de la unión de antígenos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “epítipo” se refiere a aquella porción de un polipéptido o una proteína o una molécula no proteínica que se une de manera inmunoespecífica con un anticuerpo. Un epítipo puede tener actividad inmunogénica, de modo que permita una respuesta de producción de anticuerpos en un animal. La capacidad de un epítipo para unirse de manera inmunoespecífica con un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, por medio de un inmunoensayo. No es necesario que los epítipos sean inmunogénicos.

Las expresiones “Receptor de Fc” o “FcR” se utilizan en la presente memoria para describir un receptor que se une con la región de Fc de un anticuerpo. Un FcR ejemplar es un FcR humano de secuencia nativa. Un FcR puede ser uno que se une con un anticuerpo de IgG (un gama receptor) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y Fc γ RIV, que incluyen variantes alélicas y formas divididas de manera alternativa de estos receptores, por ejemplo, existen por lo menos dos receptores de Fc γ RII conocidos, Fc γ RIIA y Fc γ RIIB. El término FcR también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “región de Fc” se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar un poco, se define que la región de Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 hasta el extremo carboxilo. La región de Fc de un IgG comprende dos dominios constantes, C $_H2$ y C $_H3$. El dominio C $_H2$ de una región de Fc de IgG humana (también denominada dominio “C $_H2$ ”) se extiende por lo general desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 338 y el dominio C $_H3$ de una región de Fc de IgG humana se extiende por lo general desde el aminoácido 342 hasta el aminoácido 447.

La expresión “sitio de glicosilación” se refiere a un residuo o restos de aminoácidos reconocidos por la célula de un mamífero como una ubicación para la unión de restos de azúcares. Los restos de aminoácidos con los que se unen carbohidratos, tales como oligosacáridos, son por lo general restos de asparagina (enlace N), serina (enlace O), y treonina (enlace O). Los sitios específicos de unión por lo general tienen una secuencia característica de aminoácidos, denominada “secuencia del sitio de glicosilación”. La secuencia del sitio de glicosilación para la glicosilación de enlace N es: Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquiera de los aminoácidos convencionales, además de prolina. La región de Fc de IgG humana tiene dos sitios de glicosilación de enlace N, uno en cada uno de los dominios C $_H2$, en la asparagina en la posición 297 (Asn 297).

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “respuesta HAMA” se refiere a la respuesta del Anticuerpo Anti-Ratón Humano, que es una respuesta inmunogénica perjudicial que ocurre cuando un sistema inmunitario humano reconoce un anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA puede provocar un choque tóxico o la muerte. Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta HAMA al disminuir las porciones no humanas de anticuerpos administrados, pero aún existe la posibilidad de una respuesta inmunológica para respuesta de Anticuerpos Humanos Anti-Humano (“respuesta HAAH”) a tales anticuerpos.

Las expresiones “cadena pesada”, “cadena ligera” (“CL”), “región variable de cadena ligera” (“VL”), “región variable de cadena pesada” (“VH”), “región de marco conservado” (“FR”), “dominio constante de cadena pesada” (“CH”), “dominio constante de cadena ligera” (“CL”) se refieren a dominios en inmunoglobulinas de origen natural y los dominios correspondientes de proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos

humanizados). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas de origen natural (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Por lo general, la inmunoglobulina de origen natural se expresa como una glicoproteína de aproximadamente 150 KDa, aunque también puede producirse IgG en una forma no glicosilada. La porción amino-terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal ("C") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un solo dominio constante y cadenas pesadas que por lo general tienen tres dominios constantes y una región en bisagra. Por lo tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG natural es N-VL-CL-C y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es N-VH-CH1-H-CH2-CH3-C (donde H es la región en bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones de determinación de complementariedad (CDR), que contienen los restos en contacto con el antígeno y segmentos distintos de CDR, denominados segmentos de estructura, que mantienen la estructura y determinan la posición de los bucles de CDR. Por lo tanto, los dominios de VL y VH tienen la estructura N-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C.

Como se utiliza en la presente memoria, el término ácido nucleico "heterólogo" indica ADN, ARN, etc. introducido en una célula hospedadora. El ácido nucleico puede derivarse de cualquiera de una diversidad de fuentes que incluyen ADN genómico, ARNm, ADNc, ADN sintético y fusiones o combinaciones de estos. El ácido nucleico puede incluir un polinucleótido de la misma célula o tipo celular que la célula hospedadora o célula receptora o un polinucleótido de un tipo celular diferente, por ejemplo, de un mamífero o planta, y puede, de manera opcional, incluir genes marcadores o de selección, por ejemplo, genes con resistencia a antibióticos, genes con resistencia a la temperatura, etc.

La expresión "región en bisagra" por lo general se define como una región que se extiende desde Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Las regiones en bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 al colocar el primer y último resto de cisteína que forma los enlaces de S-S entre la cadena pesada en las mismas posiciones.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "humanizado" tiene su significado usual en la técnica. En términos generales, la humanización de un anticuerpo no humano implica la sustitución de las secuencias de CDR de regiones V_L y V_H de inmunoglobulina no humana en las regiones de marco conservado humanas. Además, como se utiliza en la presente memoria, anticuerpos "humanizados" pueden comprender sustituciones y mutaciones adicionales en las regiones CDR y/o de marco conservado introducidas para incrementar la afinidad o para otros propósitos. Por ejemplo, las sustituciones de restos de marco conservado no humanos en la secuencia humana pueden incrementar la afinidad. Los dominios variables resultantes tienen secuencias de CDR no humanas y secuencias de marco conservado derivadas de una secuencia o secuencias de marco conservado de anticuerpos humanas o una secuencia de consenso humana. Una diversidad de diferentes regiones de marco conservado humanas pueden utilizarse solas o en combinación como base para un anticuerpo humanizado.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente inmunomodulador" y variaciones de la misma se refieren a un agente que modula un sistema inmunitario hospedador. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En algunas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "unión inmuno-específica", se refiere a la unión específica mostrada entre un anticuerpo y el epítipo que reconoce. Tal unión normalmente mostrará una K_D de por lo menos aproximadamente 0,1 mM, con mayor frecuencia por lo menos aproximadamente 1 μ M, preferentemente por lo menos aproximadamente 0,1 μ M o menos, y con mayor preferencia 0.01 μ M o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen de manera inmuno-específica con proteínas con alta afinidad (por ejemplo, K_D baja).

Un anticuerpo que se une de manera inmuno-específica con un antígeno puede unirse con otros péptidos o polipéptidos con baja afinidad, según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen de manera específica con un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen de manera específica con un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

La expresión "Técnica Dedicada a la Tecnología de Ingeniería de Anticuerpos" como se utiliza en la presente memoria se refiere a tecnología descrita en las Solicitudes de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 60/781.564; 60/945.523; 61/015.106; presentadas el 19 de diciembre de 2007 y 61/019.051 presentada el 4 de enero de 2008; la US 20040185045; la US 20040197347; la US 20040197866; la US 20050037000; la US 20050064514; la US 20050215767; la US 20060134709; la US 20060177439; la US 20070004909; la US 20070036799; la US 20070037216; la US 20070077246; la US 20070244303; la US 20080044429; la US 20080050371; 11/869.410; 11/952.568; Patente de Estados Unidos N.º 7.112.439; WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; o PCT/US07/86793

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, salvo por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades mínimas, y la expresión “anticuerpo policlonal” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos heterogéneos. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y se dirigen a un solo epítipo. Además, de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan una ventaja ya que pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. El término “monoclonal” indica que la naturaleza del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún método particular.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos pueden generarse utilizando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitación, inosina o bases tritiladas. Tales análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que proporcionan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada para cruzar membranas transcelulares. Las secuencias de ácidos nucleicos o nucleótidos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, pueden contener porciones monocatenarias y porciones bicatenarias y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferentemente, es ADN bicatenario.

Como se utiliza en la presente memoria, “Identidad de secuencia sustancial”, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias (por ejemplo, dominios) que tienen por lo menos aproximadamente 80 % de identidad de restos de aminoácidos, preferentemente por lo menos aproximadamente 90 % o por lo menos aproximadamente 95 % de identidad cuando se comparan y alinean para máxima correspondencia. La identidad de secuencias entre dos secuencias similares (por ejemplo, regiones variables de anticuerpo) puede medirse mediante algoritmos tales como el de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 [algoritmo de homología local], Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443 [algoritmo de alineamiento de homología], Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85:2444 [buscar un método de similitud], o Altschul *et al.* 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 [algoritmo BLAST]. Al utilizar cualquiera de los algoritmos mencionados en lo anterior, se utilizan los parámetros por defecto (para longitud de ventana, penalización por huecos, etc.). Se dice que una secuencia de aminoácidos es “sustancialmente similar a” una segunda secuencia cuando el grado de identidad de secuencia es por lo menos aproximadamente 70 % idéntica, preferentemente por lo menos aproximadamente 80 % o por lo menos aproximadamente 90 %, o incluso por lo menos aproximadamente 95 % idéntica. Se dice que una secuencia de ácidos nucleicos es “sustancialmente similar a” una segunda secuencia cuando: (1) el grado de identidad de secuencia es por lo menos aproximadamente 70 % idéntica, preferentemente por lo menos aproximadamente 80 %, o por lo menos aproximadamente 90 % o incluso por lo menos aproximadamente 95 % idéntica, o la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido que es por lo menos aproximadamente 70 % idéntico, preferentemente por lo menos aproximadamente 80 % o por lo menos aproximadamente 90 % o incluso por lo menos aproximadamente 95 % idéntico al polipéptido codificado por la segunda secuencia. Las secuencias que son sustancialmente idénticas también son sustancialmente similares.

Al referirse a anticuerpos, la asignación de aminoácidos a cada dominio va de acuerdo con Kabat, *Sequences Of Proteins Of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md., 1987 y 1991), que se incorpora de manera expresa en la presente memoria por referencia. En la presente memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de IgG corresponde al índice EU como en el Kabat y se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humana.

B. Anticuerpos

La presente invención abarca de manera particular anticuerpos quiméricos y polipéptidos que se unen de manera específica con HER2/neu, preferentemente HER2/neu humano. Los anticuerpos tienen glicosilación reducida en comparación con anticuerpos 4D5 conocidos tales como 4D5 murino y trastuzumab, debido a la extracción de un sitio de glicosilación en la región variable de la cadena ligera. En particular, los anticuerpos carecen de un sitio de glicosilación en la región variable de la cadena ligera, que en el 4D5 murino nativo comprende una secuencia N-R-S en las posiciones 65, 66 y 67. Preferentemente los anticuerpos tienen afinidad de unión mejorada para HER2/neu, y los anticuerpos tienen función efectora mejorada, ambos en comparación con un anticuerpo 4D5 nativo.

Los anticuerpos comprenden una cadena ligera de inmunoglobulina de 4D5 quimérico que carece de un sitio de glicosilación enlazado a N en las posiciones 65, 66 y 67 de la región variable de cadena ligera. En una realización particular, los anticuerpos comprenden una substitución en la posición 65 de la región variable de la cadena ligera (V_L). En una realización preferida, los anticuerpos comprenden una cadena ligera codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 1**, o comprenden la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de una cadena ligera preferida de la presente invención se presentan en lo siguiente:

Secuencia de ácidos nucleicos de cadena ligera quimérica (SEQ ID NO: 1):

```

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcca tagggtcagc 60
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctgggtatca gcagaaacca 120
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcaccccttc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcaactg gcagcagatc tgggacagat ttcaactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300
ggtaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tgggaactgcc tctgtttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

```

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera quimérica (SEQ ID NO: 2):

```

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVDP 60
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214

```

- 5 Estos anticuerpos que tienen una modificación en las posiciones 65 de la región V_L carecen de un sitio de glicosilación ligado a N encontrado en el anticuerpo 4D5 murino nativo, como puede observarse en la **Figura 1**, que representa una comparación ejemplar entre las secuencias de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo 4D5 quimérico que tiene una modificación N65S (SEQ ID NO: 4), y los anticuerpos 4D5 murinos nativos (SEQ ID NO: 3) y anticuerpos 4D5 humanizados (SEQ ID NO: 5). En otra realización preferida, los anticuerpos comprenden una
- 10 modificación N65S en la región V_L y preferentemente tienen una secuencia de aminoácidos en la región V_L de la SEQ ID NO: 4. Estas secuencias se presentan en lo siguiente:

Secuencia de aminoácidos de la región V_L murina nativa (SEQ ID NO: 3):

```

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVDP 60
RFTGNRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTPPTFGG GTKLEIKRA 109

```

Secuencia de aminoácidos de la región V_L quimérica (SEQ ID NO: 4):

```

15 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVDP 60
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTPPTFGG GTKVEIKRT 109

```

Secuencia de aminoácidos de la región V_L humanizada (SEQ ID NO: 5):

```

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLESGVPS 60
RFTGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKRT 109

```

La cadena pesada de una región de Fc natural de 4D5 murino está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 6 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, presentadas a continuación:

Cadena pesada que tiene una secuencia de ácidos nucleicos en la región de Fc natural (SEQ ID NO: 6):

cagggttcagc	tgcagcagtc	tggccctgag	ctggtgaagc	caggggcctc	actcaagttg	60
tcctgtacag	cttctggctt	caacatcaaa	gacacctata	tccactgggt	gaaacagagg	120
cctgaacagg	gcctggaatg	gattggaagg	atttatccta	ccaatggcta	tactagatat	180
gacccaaagt	tccaggacaa	ggccactatc	acagcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240
ctgcaagtca	gccgcctgac	atctgaggac	actgccgtct	attactgctc	ccggtgggga	300
ggggacggct	tctatgctat	ggactactgg	ggtcagggag	cctccgtgac	cgtgagctcc	360
gcctccacca	agggcccata	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacacettcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctaact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggt	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcattgatctc	ccggaccctt	780
gaggtcacat	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	900
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1353

Cadena pesada que tienen secuencia de aminoácidos en la región de Fc natural (SEQ ID NO: 7):

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	DTYIHVVKQR	PEQGLEWIGR	IYPTNGYTRY	60
DPKFQDKATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGASVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	240
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	300
STYRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGPQPREPQ	VYTLPPSRDE	360
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	420
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				450

- 5 La cadena pesada de los anticuerpos de la invención son variantes de la cadena pesada de anticuerpo 4D5 murino, y comprende una región de Fc variante: FcMT1, FcMT2 o FcMT3. Estas secuencias se presentan a continuación:

Cadena pesada que tiene una secuencia de ácidos nucleicos en la región de Fc variante FcMT1 (SEQ ID NO: 8):

caggttcagc	tgacagcagtc	tggccctgag	ctggtgaagc	caggggcctc	actcaagttg	60
tcctgtacag	cttctggctt	caacatcaaa	gacacctata	tccactgggt	gaaacagagg	120
cctgaacagg	gcctggaatg	gattggaagg	atttatccta	ccaatggcta	tactagatat	180
gacccaaagt	tccaggacaa	ggccactatc	acagcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240
ctgcaagtca	gccgcctgac	atctgaggac	actgccgtct	attactgctc	ccggtgggga	300
ggggacggct	tctatgctat	ggactactgg	ggtcagggag	cctccgtgac	cgtgagctcc	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcgcccctgac	cagcggcgtg	cacacettcc	cggtgttcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttggt	acaaaactca	catatgccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttacc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctt	780
gaggtcacat	gcgtggtggt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgccggagga	gcagtacaac	900
agcacgtccc	gtgtggtcag	catcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctctcgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgct	tccgggtaaa	tga			1353

Cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos en la región Fc variante FcMT1 (SEQ ID NO: 9):

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	DTYIHVVKQR	PEQGLEWIGR	IYPTNGYTRY	60
DPKFQDKATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGASVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	240
PSVFLLPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPPEEQYN	300
STLRVVSILT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	360
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPLV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	420
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				450

5 Cadena pesada que tiene una secuencia de ácidos nucleicos en la región de Fc variante FcMT2 (SEQ ID NO: 10):

caggttcagc	tgacagcagtc	tggccctgag	ctggtgaagc	caggggcctc	actcaagttg	60
tcctgtacag	cttctggctt	caacatcaaa	gacacctata	tccactgggt	gaaacagagg	120
cctgaacagg	gcctggaatg	gattggaagg	atttatccta	ccaatggcta	tactagatat	180
gacccaaagt	tccaggacaa	ggccactatc	acagcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240

ES 2 587 937 T3

ctgcaagtca	gccgcctgac	atctgaggac	actgccgtct	attactgctc	ccggtgggga	300
ggggacggct	tctatgctat	ggactactgg	ggtcagggag	cctccgtgac	cgtgagctcc	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacggtgtcg	480
tggaaactcag	gcgccttgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cgtgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttacc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcattgatctc	ccggaccct	780
gaggtcacat	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgccggagga	gcagtacaac	900
agcacgtcc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctctcgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1353

Cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos en la región de Fc variante FcMT2 (SEQ ID NO: 11):

gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctctcgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1353

Cadena pesada que tiene una secuencia de ácidos nucleicos en la región de Fc variante FcMT3 (SEQ ID NO:

5 12):

caggttcagc	tgcagcagtc	tggccctgag	ctggtgaagc	caggggcctc	actcaagttg	60
tcctgtacag	cttctggctt	caacatcaaa	gacacctata	tccactgggt	gaaacagagg	120
cctgaacagg	gcctggaatg	gattggaagg	atttatccta	ccaatggcta	tactagatat	180
gacccaaagt	tccaggacaa	ggccactatc	acagcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240
ctgcaagtca	gccgcctgac	atctgaggac	actgccgtct	attactgctc	ccggtgggga	300
ggggacggct	tctatgctat	ggactactgg	ggtcagggag	cctccgtgac	cgtgagctcc	360
gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacggtgtcg	480
tggaaactcag	gcgccttgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgtg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tcctcttacc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcattgatctc	ccggaccct	780
gaggtcacat	gcgtgggtgg	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgccggagga	gcagtacaac	900
agcacgtcc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	1080
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccggtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	tga			1353

Cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos en la región de Fc variante FcMT3 (**SEQ ID NO: 13**):

QVQLQQSGPE	LVKPGASLKL	SCTASGFNIK	DTYIHWVKQR	PEQGLEWIGR	IYPTNGYTRY	60
DPKFQDKATI	TADTSSNTAY	LQVSRLTSED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGASVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	240
PSVFLLPKP	KDTLMIS RTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPPEEQYN	300
STLRVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	360
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	420
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				450

En una realización, una cadena pesada de 4D5 variable tiene una modificación en la Región de Fc, y se codifica por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 8** o comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 9**, o se codifica por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 10** o comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 11**, o se codifica por la secuencia de ácidos nucleicos de la **SEQ ID NO: 12** o comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**. Los anticuerpos comprenden una cadena pesada codificada por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 8**, la **SEQ ID NO: 10** y la **SEQ ID NO: 12**, o que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 9**, la **SEQ ID NO: 11** y la **SEQ ID NO: 13**.

Un anticuerpo anti-HER2/neu comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una modificación N65S en la región V_L y una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una región de Fc modificada. Preferentemente, un anticuerpo anti-HER2/neu comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 9**, la **SEQ ID NO: 11** y la **SEQ ID NO: 13**. En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención comprende, además, un dominio constante de cadena ligera fusionado con un dominio variable de cadena ligera, que en algunas realizaciones comprende por lo menos la **SEQ ID NO: 4**. En otras realizaciones, se modifica el anticuerpo, un fragmento o un fragmento modificado.

Los anticuerpos 4D5 quiméricos se generaron de acuerdo con las diversas realizaciones de la invención, para mejorar la unión y activar los receptores de Fc de baja afinidad y para no alterar o solo incrementar de manera mínima la unión con el receptor CD32B inhibidor de baja afinidad (FcγRII-B). Los anticuerpos incluyen los siguientes anticuerpos optimizados con Fc y naturales:

- Fc natural ch4D5, que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 7**. El Fc natural ch4D5 tiene una sustitución N65S en la cadena ligera, que resulta en una cadena ligera desglicosilada.
- ch4D5-FcMT1, que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 9**. ch4D5-FcMT1 tiene una sustitución N65S en la cadena ligera, lo que resulta en la cadena ligera desglicosilada, y sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L en la cadena pesada (todas numeradas de acuerdo con Kabat). ch4D5-FcMT1 muestra un incremento de 10 veces en la unión con CD16A (FcγRIII-A), y la unión con CD16-158^{phe} mejora en un modo proporcionalmente mayor que la unión con CD16-158^{Val}.
- ch4D5-FcMT2, que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2** y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 11**. ch4D5-FcMT2 tiene una sustitución N65S en la cadena ligera, que resulta en una cadena ligera desglicosilada, y sustituciones L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L en la cadena pesada (todas numeradas de acuerdo con Kabat). Este anticuerpo es un ajuste adicional del anticuerpo ch4D5-FcMT1, y tiene propiedades de unión a CD16A similares, aunque también una reducción más favorable en la unión con CD32B (FcγRII-B).
- ch4D5-FcMT3, que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**, y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 13**. ch4D5-FcMT3 tiene una sustitución N65S en la cadena ligera, que resulta en una cadena ligera desglicosilada y sustituciones F243L, R292P y Y300L en la cadena pesada (todas numeradas de acuerdo con Kabat). Este anticuerpo es un ajuste adicional del anticuerpo ch4D5-FcMT1 y tiene propiedades de unión a CD16A similares, aunque también tiene una reducción más favorable al unirse con CD32B (FcγRII-B).
- ch4D5-Ag
- ch4D5-N297Q, que tiene una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 2**, y una cadena pesada que tiene una sustitución de N297Q (numerada de acuerdo con Kabat).

Una comparación de las secuencias de cadena pesada del Fc natural ch4D5 y las variantes optimizadas con Fc ch4D5-FcMT1, ch4D5-FcMT2 y ch4D5-FcMT3 se muestra en la **Figura 2**. Las CDR se indican con barras negras

mostradas por debajo de los restos pertinentes.

Los anticuerpos contemplados por la presente invención pueden estar en un complejo entre sí o con otros polipéptidos que no son de inmunoglobulina (por ejemplo, enzimas, hormonas, proteínas estructurales, etc.). Por ejemplo, una realización puede proporcionar un complejo polipeptídico que comprende dos polipéptidos, en donde uno de dichos polipéptidos comprende una cadena pesada y el otro polipéptido comprende una cadena ligera variable o en donde ambos polipéptidos comprenden las mismas secuencias. La formación de complejos puede mediar a través de cualquier técnica adecuada, que incluye dimerización/multimerización en un dominio de dimerización/multimerización tal como los que se describen en la presente memoria o interacciones covalentes (tal como a través de enlace de disulfuro) (que en algunos contextos forma parte de un dominio de dimerización, por ejemplo, un dominio de dimerización puede contener una secuencia de cremallera de leucina y una cisteína). En otra realización, una composición puede comprender polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención, por ejemplo, una composición puede comprender una pluralidad de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Una composición que comprende un polinucleótido o polipéptido puede estar en la forma de un equipo o un artículo de fabricación (de manera opcional envasado con instrucciones, tampones, etc.).

También se contempla que puedan prepararse variantes polipeptídicas (y en particular variantes de anticuerpo). Las variantes polipeptídicas pueden poseer modificaciones en la secuencia (por ejemplo, sustituciones, supresiones y/o adiciones) en posiciones deseadas dentro de las secuencias de aminoácidos relativas a las secuencias de aminoácidos nativos. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácido pueden alterar los procesos post-traducción del anticuerpo o polipéptido, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje de la membrana. En una realización preferida, las variantes de anticuerpos y polipéptidos son variantes en la región de Fc.

Las variantes pueden tener la misma actividad o actividad alterada en comparación con un anticuerpo o polipéptido nativo. Por ejemplo, puede ser deseable que la variante tenga la misma actividad, aunque esté modificada en una manera que sea más estable o que tenga una vida más prolongada *in vivo*, por ejemplo, al conjugar el anticuerpo con albúmina o un epítipo de unión con receptores de rescate, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.739.277. O, por ejemplo, puede ser deseable que un anticuerpo tenga una afinidad de unión mayor con antígenos, aunque la misma función efectora que un anticuerpo nativo, o puede ser deseable que un anticuerpo tenga la misma afinidad de unión con antígenos, aunque una función efectora disminuida. La actividad puede someterse a prueba, por ejemplo, utilizando ensayos *in vitro* tales como ensayos ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos de unión de proteínas radioetiquetadas (RIA) o ensayos de inmunoprecipitación.

Las modificaciones sustanciales en la función o en la identidad inmunológica pueden realizarse seleccionando modificaciones que difieran de manera significativa en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la modificación, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula del sitio objetivo o (c) el volumen de la cadena lateral. También puede emplearse un análisis de exploración de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua, por ejemplo, como describen Cunningham y Wells (1989) Science 244:1081-1085. Entre los aminoácidos preferidos para la exploración hay aminoácidos neutros relativamente pequeños, tales como alanina, glicina, serina y cisteína. Normalmente, la alanina es un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque es el aminoácido más común, se encuentra con frecuencia en posiciones ocultas y expuestas y porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico. Además, cualquier resto de cisteína no involucrado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo o polipéptido puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad de oxidación de la molécula e impedir reticulación aberrante. Sin embargo, en ciertas circunstancias, en particular, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv, puede añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo o polipéptido para mejorar su estabilidad.

B1. Variantes del Dominio de Fc

Los polipéptidos de la presente invención pueden tener dominios de Fc variantes. La modificación del dominio de Fc normalmente lleva a un fenotipo alterado, por ejemplo, una semivida en suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a enzimas celulares o función efectora alterada. Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de mejorar la efectividad del anticuerpo para tratar, por ejemplo, cáncer. La reducción o eliminación de funciones efectoras es deseable en ciertos casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción involucra el bloqueo o antagonismo, pero sin destruir las células que portan un antígeno objetivo. Por lo general, se desea una función efectora incrementada cuando esta se dirige a células no deseadas, tales como células tumorales y extrañas, donde los FcγR se expresan en niveles bajos, por ejemplo, linfocitos B específicos para tumores con un bajo nivel de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano, CLL y linfoma de Burkitt). Las moléculas de la invención con actividad de funciones efectoras conferidas o alteradas son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea mayor eficacia de la actividad de las funciones efectoras.

Las moléculas de la invención comprenden modificaciones a los aminoácidos del dominio de Fc, que reducen la afinidad y la avidez de la región de Fc y, por lo tanto, la molécula de la invención, para uno o más receptores de Fc γ R. Las moléculas de la invención comprenden modificaciones a los aminoácidos de la región de Fc, lo que incrementa la afinidad y avidez de la región de Fc y, por lo tanto, la molécula de la invención, para uno o más receptores de Fc γ R. Las moléculas comprenden un dominio de Fc variante en donde dicha variante confiere o interviene en la actividad ADCC incrementada y/o una unión incrementada con Fc γ RIIA, en relación con una molécula que no comprende un dominio de Fc o que comprende un dominio de Fc natural.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender afinidades alteradas para un receptor Fc γ y activador y/o inhibidor. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región de Fc variante que tienen afinidad disminuida para Fc γ RIIB y afinidad incrementada para Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA, en relación con una molécula comparable con una región de Fc natural. En aún otra realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región de Fc variante que tiene afinidad no modificada para Fc γ RIIB y una afinidad disminuida (o incrementada) para Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA, en relación con una molécula comparable con una región de Fc natural.

La invención abarca inmunoglobulinas que comprenden una región de Fc variante con una afinidad alterada para Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIA de modo que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada, por ejemplo, una citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras incluyen citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependientes de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes de complementos.

En una realización preferida, la alteración en la afinidad o función efectora es por lo menos de 2 veces, preferentemente por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 6 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 8 veces, por lo menos 9 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces o por lo menos 100 veces, en relación con una molécula comparable que comprende una región de Fc natural. En otras realizaciones de la invención, la región de Fc variante se une de manera inmuno-específica con uno o más FcRs con por lo menos 65 %, preferentemente por lo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 225 % o 250 % más afinidad en relación con una molécula que comprende una región de Fc natural. Tales medidas pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro* y en una realización preferida son ensayos *in vitro*, tales como ELISA o ensayos de resonancia de plasmón superficial.

En diferentes realizaciones, las moléculas comprenden un dominio de Fc variante en donde dicha variante es agonista de por lo menos una actividad de un receptor Fc γ R, o antagoniza por lo menos una actividad de un receptor Fc γ R. En una realización preferida, las moléculas comprenden una variante que es agonista de (o antagoniza) una o más actividades de Fc γ RIIB, por ejemplo, señalización mediada por receptores de linfocitos B, activación de linfocitos B, proliferación de linfocitos B, producción de anticuerpos, afluencia de calcio intracelular de linfocitos B, avance del ciclo celular, inhibición mediada por Fc γ RIIB de señalización de Fc ϵ RI, fosforilación de Fc γ RIIB, reclutamiento de SHIP, fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o actividad de una o más moléculas corriente abajo (por ejemplo, MAP quinasa, JNK, p38 o Akt) en la ruta de transducción de señales de Fc γ RIIB. En otra realización, las moléculas comprenden una variante que es agonista de (o antagoniza) una o más actividades de Fc ϵ RI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción de citoquinas o liberación de serotonina.

En una realización específica preferida, las moléculas comprenden una región de Fc variante, en donde dicha región de Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácidos en relación con una región de Fc natural, de modo que dicha molécula tiene una afinidad alterada para un FcR, siempre que dicha región de Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que entren en contacto directo con Fc γ R, con base en un análisis cristalográfico y estructural de las interacciones de Fc-FcR, tales como aquellas que describe Sondermann *et al.* (2000) Nature 406:267-273. Los ejemplos de posiciones dentro de la región de Fc que entran en contacto directo con Fc γ R son los restos de aminoácidos 234-239 (región en bisagra), los restos de aminoácidos 265-269 (bucle B/C), restos de aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los restos de aminoácidos 327-332 (bucle F/G). En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden regiones de Fc variantes que comprenden modificación de por lo menos un residuo que no entre en contacto directo con un Fc γ R con base en análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no se encuentra dentro del sitio de unión de Fc-Fc γ R.

Las moléculas comprenden una región de Fc variante que tiene modificaciones de aminoácidos, cuya modificación o modificaciones alteran (en relación con una región de Fc natural) la Proporción de Afinidades de la región de Fc variante con un Fc γ R de activación (tal como Fc γ RIIA o Fc γ RIIA) en relación con un Fc γ R de inhibición (tal como Fc γ RIIB):

$$\text{Proporción de Afinidades} = \frac{\text{Cambio de natural a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{activador}}}{\text{Cambio de natural a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{inhibidor}}}$$

Cuando una variante de Fc tiene una Proporción de Afinidades mayor que 1, los métodos de la invención tienen un

uso particular al proporcionar tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, trastorno o infección, o para mejorar un síntoma de los mismos, en donde se desea eficacia mejorada de la función celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedades infecciosas. Cuando una variante de Fc tiene una Proporción de Afinidades menor que 1, puede tener uso para proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno o para mejorar un síntoma de los mismos, donde se desea una eficacia reducida de la función celular efectora mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. La **Tabla 2** enumera mutaciones ejemplares individuales, dobles, triples, cuádruples y quintuples, cuya Proporción de Afinidades es mayor que o menor que 1. Se enumeran datos de unión específica para diversas mutaciones en la **Tabla 3** y puede encontrarse más información sobre estas mutaciones en la técnica sobre Tecnología de Ingeniería de Anticuerpos.

Tabla 2: Mutaciones Únicas y Múltiples Ejemplares Listadas por Proporción de Afinidades					
Proporción	Única	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
≥ 1	F243L D270E R292G R292P	F243L & R292P F243L & Y300L F243L & P396L D270E & P396L R292P & Y300L R292P & V305I R292P & P396L Y300L & P396L P396L & Q419H	F243L, P247L & N421K F243L, R292P & Y300L F243L, R292P & V305I F243L, R292P & P396L F243L, Y300L & P396L P247L, D270E & N421K R255L, D270E & P396L D270E, G316D & R416G D270E, K392T & P396L D270E, P396L & Q419H V284M, R292L & K370N R292P, Y300L & P396L	L234F, F243L, R292P & Y300L L235I, F243L, R292P & Y300L L235Q, F243L, R292P & Y300L F243L, P247L, D270E & N421K F243L, R255L, D270E & P396L F243L, D270E, G316D & R416G F243L, D270E, K392T & P396L F243L, D270E, P396L & Q419H F243L, R292P, Y300L, & P396L F243L, R292P, V305I & P396L P247L, D270E, Y300L & N421K R255L, D270E, R292G & P396L R255L, D270E, Y300L & P396L D270E, G316D, P396L & R416G	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
< 1	Y300L P396L	F243L & P396L P247L & N421K R255L & P396L R292P & V305I K392T & P396L P396L & Q419H	F243L, R292P & V305I		

Tabla 3: Información de Unión Detallada para Variantes de Fc Ejemplares					
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Proporción de Afinidades	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
Proporción de Afinidades > 1					
Clase I: Unión Incrementada con CD16; Unión Disminuida con CD32B					
F243L	4,79	3,44	0,84	5,70	4,10
F243L P247L D270E N421K	2,30	3,45	0,32	7,19	10,78
F243L P247L N421K	1,89	1,71	0,17	11,12	10,06
F243L R255L D270E P396L	1,75	1,64	0,38	4,61	4,32
F243L D270E G316D R416G	1,50	1,34	0,20	7,50	6,70
F243L D270E K392T P396L	3,16	2,44	0,44	7,18	5,55
F243L D270E P396L Q419H	1,46	1,15	0,26	5,62	4,42
F243L R292P	4,73		0,12	39,4	
F243L R292P	4	1,67	0,16	25	10,44
F243L R292P P300L	6,69	2,3	0,32	20,9	7,19
F243L R292P V305I	2,56	1,43	ND	>25	>25
F243L R292P V305I P396L	5,37	2,53	0,40	13,43	6,33
P247L D270E N421K	1,89	2,46	0,58	3,26	4,24
R255L D270E R292G P396L	1,39	1,30	0,65	2,14	2,00
R255L D270E Y300L P396L	1,52	1,74	0,87	1,75	2,00

Tabla 3: Información de Unión Detallada para Variantes de Fc Ejemplares					
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Proporción de Afinidades	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
R255L D270E P396L	1,34	1,65	0,87	1,54	1,90
D270E	1,25	1,48	0,39	3,21	3,79
D270E G316D R416G	2,18	2,49	0,78	2,79	3,19
D270E K392T P396L	1,81	2,28	0,79	2,29	2,89
D270E P396L	1,38	1,65	0,89	1,55	1,85
D270E P396L G316D R416G	1,22		1,07	1,14	
D270E P396L Q419H	1,64	2,00	0,68	2,41	2,94
V284M R292P K370N	1,14	1,37	0,37	3,1	3,7
R292G	1,54		0,25	6,2	
R292P	2,90		0,25	11,60	
R292P V305I	1,32	1,28	0,37	3,6	3,46
Clase II: Unión Disminuida con CD16; Unión Muy Disminuida con CD32B					
R292P		0,64	0,25		2,56
R292P F243L		0,6	0,12		5,00
Clase III: Unión Incrementada con CD16; Unión No Modificada con CD32B					
F243I R292P Y300L V305I P396L	10,9	3,12	1,05	10,4	2,97
F243L R292P Y300L P396L	10,06	5,62	1,07	9,40	5,25
R292P V305I P396L	1,85	1,90	0,92	2,01	2,07
Clase IV: Unión Muy Incrementada para CD16; Unión Incrementada con CD32B					
F243L R292P Y300L V305I P396L	10,06	8,25	1,38	7,29	5,98
D270E G316D P396L R416G	1,22		1,07	1,14	
Proporción de Afinidades < 1					
Clase V: Unión Sin Modificación con CD16; Unión Incrementada con CD32B					
R255L P396L	1,09		2,22	0,49	
Y300L	1,01		1,18		0,99
Clase VI: Unión Incrementada con CD16; Unión Muy Incrementada con CD32B					
F243L P396L	1,49	1,60	2,22	0,67	0,72
P247L N421K	1,29	1,73	2,00	0,65	0,87
R255L P396L		1,39	2,22	0,49	0,63
R292P V305I	1,59	2,11	2,67	0,60	0,79
K392T P396L	1,49	1,81	2,35	0,63	0,77

Tabla 3: Información de Unión Detallada para Variantes de Fc Ejemplares					
Secuencia de Fc	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	Proporción de Afinidades	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
P396L	1,27	1,73	2,58	0,49	0,67
P396L Q419H	1,19	1,19	1,33	0,89	0,89
Clase VII: Unión Disminuida con CD16; Unión Incrementada/Sin Modificaciones con CD32B					
D270E G316D P396L R416G		0,94	1,07		0,88

En otras realizaciones, las moléculas comprenden una región de Fc variante que tiene una o más substituciones de aminoácidos, cuyas substituciones alteran (en relación con una región de Fc natural) la unión de la región de Fc variante, por ejemplo, mejoran la unión con un Fc γ R de activación (tal como Fc γ RIIA o Fc γ RIIAA) y/o reducen la unión con un Fc γ R de inhibición (tal como Fc γ RIIB). Diversas mutaciones de Fc que tienen uno o más cambios de aminoácidos se modificaron por ingeniería y se analizaron mediante resonancia de plasmón superficial para k_{off} , como se muestra en la **Tabla 4**. Las constantes de la tasa de disociación para la unión de los diversos Fc γ R se determinaron mediante análisis BIAcore y se compararon directamente con los del Fc natural, con la proporción ($x = k_{off} \text{ WT}/k_{off} \text{ mutante}$) indicada en las columnas del lado derecho de la **Tabla 4** con respecto a cada Fc γ R sometido a prueba.

Tabla 4: Comparación de k_{off} de Fc Mutantes con Fc Naturales												
M	El o los Cambios de Aminoácido							CD16A ^V	CD16A ^F	CD32A ^H	CD32B	
Un aminoácido												
1	F243L							4,8	3,4	0,6	0,8	
2		D270E						1,3	1,5	2,2	0,4	
3			R292P					2,4	1,6	0,7	0,3	
4				S298N				nd	nd	nt	0,2	
5					Y300L			1,0	1,2	2,9	1,2	
6						V305I		0,9	0,6	1,3	1,2	
7							A330V	0,6	1,2	0,4	0,3	
8							P396L	1,3	1,7	1,6	2,6	
Dos aminoácidos												
9	F243L						P396L	2,2	2,0	1,5	1,6	

10	F243L		R292P					4,0	1,7	0,5	0,2
11			R292P		V305I			1,3	1,3	0,8	0,4
Tres aminoácidos											
12	F243L		R292P		Y300L			7,4	4,6	1,0	0,6
13	F243L		R292P		V305I			2,6	1,4	0,2	0,1
14	F243L		R292P				P396L	6,3	3,4	1,4	0,4
15			R292P		V305I		P396L	1,9	1,9	1,5	0,9
Cuatro aminoácidos											
16	F243L		R292P		Y300L		P396L	10,1	5,6	1,7	1,1
17	F243L		R292P		V305I		P396L	4,0	2,3	0,8	0,4
Cinco aminoácidos											
18	F243L		R292P		Y300L	V305I	P396L	10,1	8,3	3,2	1,4
Abreviaturas: M, Número del Mutante; nd, unión no detectable; nt, no probado. Los valores con una diferencia $\geq 80\%$ ($\geq 0,8$ veces) del natural en cualquier dirección se encuentran en negritas. El sombreado denota mutantes de Fc identificados directamente mediante presentación en levadura; todos los demás mutantes se generaron mediante mutagénesis dirigida.											

B2. Otras Modificaciones

Las variantes polipeptídicas (en especial las variantes de anticuerpo) de la presente invención incluyen análogos y derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre y cuando dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión con epítopos. Por ejemplo, pero sin limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado aún más, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, división proteolítica, enlace con una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo a través de técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación división química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. De manera adicional, el derivado o análogo puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos y polipéptidos pueden modificarse al introducir uno o más sitio de glicosilación en los anticuerpos, suprimir uno o más sitios de glicosilación de los anticuerpos, o cambiar un sitio de glicosilación existente en los anticuerpos, preferentemente sin alterar la funcionalidad deseada de los anticuerpos, por ejemplo, actividad de unión. Los sitios de glicosilación pueden introducirse en, o suprimirse de, la región variable y/o constante de los anticuerpos mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos para modificar los contenidos de carbohidratos (glicosilación) de las proteínas se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.472.511 y 6.218.149; las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 20030115614 y 20020028486; EP 0359096 B1; y WO 03/035835.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se modifican con ingeniería genética para comprender un patrón de glicosilación alterado o una glicoforma alterada. Las glicoformas modificadas por ingeniería genética pueden ser útiles para una diversidad de propósitos, que incluyen, pero sin limitación, función efectora mejorada. Las glicoformas modificadas por ingeniería genética pueden generarse a través de cualquier método conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando cepas de expresión variantes o modificadas por ingeniería genética, mediante la co-expresión con una o más enzimas, por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), expresando un anticuerpo de la invención en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando el carbohidrato o carbohidratos después de expresar y purificar el anticuerpo. Se conocen en la técnica métodos para generar glicoformas modificadas por ingeniería genética e incluyen pero sin limitación los descritos, por ejemplo, en Okazaki *et al.* (2004) JMB 336:1239-1249; Shinkawa *et al.* (2003) J Biol Chem 278:3466-3473; Shields *et al.* (2002) J Biol Chem 277:26733-26740; Davies *et al.* (2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotechnol 17:176-180; Patente de Estados Unidos N.º 6.602.684; Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 20030157108, 20030115614 y 20030003097; WO 02/311140; WO 02/30954; WO 01/292246; WO 00/61739; tecnología Potillegent™ disponible de Biowa, Inc. (Princeton, NJ); y la tecnología de modificación por

ingeniería genética de glicosilación GlycoMAb™ disponible por GLYCART biotechnology AG (Zúrich, Suiza).

B3. Conjugados Polipeptídicos

Los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse químicamente (que incluye conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con polipéptidos heterólogos o porciones de los mismos para generar proteínas de fusión. Preferentemente, el polipéptido de la presente invención (en especial un anticuerpo) se fusiona con por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90 o por lo menos 100 amino ácidos del polipéptido heterólogo para generar una proteína de fusión deseada. La fusión no necesariamente tiene que ser directa, sino que puede ocurrir a través de secuencias de enlace. Los polipéptidos de la presente invención también pueden unirse con soportes sólidos o matrices semi-sólidas, que en particular son útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno objetivo. Tales soportes y matrices incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, microesferas de agarosa, microesferas de acrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. La unión puede obtenerse, por ejemplo, mediante métodos descritos en *Methods in Enzymology*, 44 (1976).

Los anticuerpos y polipéptidos pueden conjugarse con un agente terapéutico para modificar una respuesta biológica determinada, afectar (por ejemplo, incrementar) la semivida en suero del agente terapéutico, o dirigir el agente terapéutico a un subconjunto particular de células. Estos también pueden fusionarse con secuencias marcadoras (por ejemplo, un péptido de hexa-histidina o una etiqueta "indicadora") para facilitar la purificación. Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos, se conocen bien; véase, por ejemplo, Hellstrom *et al.*, "Antibody For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed., Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.).

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales a través de la técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposiciones de exones y/o transposición de codones (denominadas en su conjunto "transposición de ADN"). La transposición de ADN puede emplearse para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más elevadas e índices de disociación más bajos). Los anticuerpos y polipéptidos de la invención, o sus ácidos nucleicos codificantes, pueden alterarse además al someterse a mutagénesis aleatoria mediante PCR susceptible a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención, pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

B4. Diacuerpos y DART

También se proporcionan diacuerpos y reactivos de redireccionamiento de afinidad doble ("DART") en la presente invención. Los diacuerpos y DART comprenden dominios de unión con antígenos derivados por lo general de los anticuerpos y polipéptidos de la invención. El diseño y construcción de los diacuerpos y DART se describen en, por ejemplo, la Solicitud de Patente Provisional De Estados Unidos N.º 61/019.051 presentada el 4 de enero de 2008 y 60/945,523 presentada el 21 de junio de 2007; Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 11/409.339 presentada el 17 de abril de 2006; Marvin *et al.* (2005) *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658; Olafsen *et al.* (2004) *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448. Cada cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo comprende un dominio V_L y un dominio V_H , del mismo anticuerpo o de diferentes anticuerpos, que se unen covalentemente de modo que se restringe el autoensamblaje de los dominios. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos pares V_L - V_H , que forman dos sitios de unión con epítopos, es decir, una molécula bivalente. Ninguno de los dominios de V_H o V_L está limitado a ninguna posición dentro de la cadena polipeptídica, ni existen dominios restringidos en sus posiciones relativas respecto al otro; la única restricción es que una cadena polipeptídica complementaria esté disponible para formar un diacuerpo funcional. Los dominios pueden separarse a través de un enlazador peptídico y las cadenas polipeptídicas pueden modificarse con ingeniería genética para comprender por lo menos un resto de cisteína en cada cadena, de modo que puedan formarse enlaces de disulfuro entre las cadenas para estabilizar el diacuerpo.

Cuando los dominios V_L y V_H se derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas, lo que tiene como consecuencia un anticuerpo monoespecífico bivalente, o pueden ser diferentes, lo que tiene como consecuencia un anticuerpo biespecífico bivalente (por ejemplo, uno que se une con dos epítopos diferentes en el mismo antígeno). Cuando los dominios V_L y V_H se derivan de anticuerpos específicos para antígenos diferentes, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, formación de un heterodímero. En una realización particular, por lo menos un sitio de unión con epítopos del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como una célula B o una célula T, una célula fagocitaria, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

En diversas realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprenden un dominio Fc. Los dominios Fc en las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo preferentemente se dimerizan, lo que resulta en la formación de una molécula de diacuerpo que muestra propiedades similares a la inmunoglobulina, por ejemplo interacciones Fc-Fc γ R. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, que comprenden dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una un dominio V_H , un dominio V_L y un dominio Fc.

En diversas realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio en bisagra, que puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En realizaciones preferidas, el dominio en bisagra se deriva de IgG, en donde el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de las mismas. El dominio en bisagra puede modificarse con ingeniería genética para convertirse en una cadena polipeptídica en cualquier posición relativa a otros dominios o porciones de la cadena, y en ciertas circunstancias puede modificarse por ingeniería genética junto con un dominio Fc de modo que la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc en bisagra.

En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros, que pueden comprender dos cadenas polipeptídicas "más pesadas" (es decir una cadena polipeptídica que comprende un dominio V_L , V_H y Fc), y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras" (es decir, una cadena polipeptídica que comprende un V_L y un V_H). Tales cadenas más ligeras y más pesadas pueden interactuar para formar un monómero e interactuar a través de sus dominios Fc no emparejados para formar una molécula similar a Ig, que puede ser una molécula DART. Tal diacuerpo similar a Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico. La especie DART similar a Ig tiene propiedades únicas, porque sus dominios pueden diseñarse para unirse con el mismo epítipo (con el fin de formar un DART similar a Ig específico para monoepítopos tetravalentes capaz de unirse con cuatro moléculas de antígenos idénticas), o con diferentes epítopos o antígenos. Por ejemplo, sus dominios pueden diseñarse para unirse con dos epítopos del mismo antígeno (para formar un DART similar a Ig específico para biepitopos, específicos para mono-antígenos, tetravalentes), o con epítopos de diferentes moléculas de antígenos para formar un DART similar a Ig tetravalente que tiene un par de sitios de unión específicos para un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos para un segundo antígeno). Las moléculas híbridas que tienen combinaciones de tales atributos pueden producirse de manera sencilla.

Aunque no se pretende estar limitado por ningún mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpos de la invención muestran eficacia terapéutica mejorada en relación con anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo para unirse de manera inmuno-específica con una célula objetivo que expresa un antígeno particular (por ejemplo, $FC\gamma R$) en niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo para permanecer en la célula objetivo durante más tiempo debido a una habilidad mejorada de la interacción de diacuerpo-epítipo. De esta manera, los diacuerpos de la invención tienen utilidad particular para el tratamiento, prevención o gestión de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, en una sub-población, en donde el antígeno objetivo se expresa a bajos niveles en la población celular objetivo.

Debido a su valencia incrementada, los bajos índices de disociación y rápida eliminación de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, o de por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también muestran un uso particular en el campo de la generación de imágenes tumorales. (Fitzgerald *et al.* (1997) *Protein Eng.* 10:1221). Es en particular importante la reticulación de diferentes células, por ejemplo, la reticulación de células T citotóxicas con células tumorales (Staerz *et al.* (1985) *Nature* 314:628-631; Holliger *et al.* (1996) *Protein Eng.* 9:299-305). Los dominios de unión con epítopos de diacuerpos también puede dirigirse a una superficie que determine cualquier célula efectora inmunitaria tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en los linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, la unión de diacuerpo con determinantes de células efectoras, por ejemplo, receptores $FC\gamma$ ($FC\gamma R$), también ha demostrado activar la célula efectora. (Holliger *et al.* (1996) *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59:2909-2916). Normalmente, la activación de células efectoras se desencadena mediante la unión de un anticuerpo unido a un antígeno con una célula efectora a través de la interacción de Fc- $FC\gamma R$; por lo tanto, en ese sentido, las moléculas de diacuerpos de la invención pueden mostrar una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc. Al reticular células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo atrae a la célula efectora cerca de las células tumorales, sino que conduce a la eliminación efectiva del tumor. Cao y Lam (2003) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-97.

Las moléculas de diacuerpos de la presente invención pueden producirse utilizando una diversidad de métodos que incluyen síntesis nueva de proteínas y expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácidos nucleicos deseadas pueden producirse mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis PCR de una variante preparada en lo anterior del polinucleótido deseado) o mediante síntesis de ADN en fase sólida. Preferentemente, se utilizan métodos de expresión recombinante. En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un V_H y/o un V_L de CD16A; en otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un V_H y/o V_L de CD32B. Debido a la degeneración del código genético, una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos codifican cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en la presente memoria.

B5. Producción de Anticuerpos

Los anticuerpos de las realizaciones preferidas de la invención pueden producirse u obtenerse en cualquiera de una diversidad de formas. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden obtenerse a partir de plasma, de manera sintética, recombinante o transgénica mediante una célula (por ejemplo, cultivo de hibridomas), etc. La producción de proteínas sintéticas se ha descrito en, por ejemplo, Dawson *et al.* (2000) *Ann. Rev. Biochem.* 69:923-960; Wilken *et al.* (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):412-426; y Kochendoerfer *et al.* (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(6):665-671.

La producción de anticuerpos recombinantes y transgénicos se ha descrito en, por ejemplo, Wang *et al.* (2007) *IDrugs* 10(8):562-565; Hagemeyer *et al.* (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33(2):185-195; Rasmussen *et al.* (2007) *Biotechnol. Lett.* 29(6):845-852; Gasser *et al.* (2007) *Biotechnol. Lett.* 29(2):201-212; Aubrey *et al.* (2006) *J. Soc. Biol.* 200(4):345-354; Laffly *et al.* (2006) *J. Soc. Biol.* 200(4):325-343; Jefferis (2005) *Biotechnol. Prog.* 21(1):11-16; Smith *et al.* (2004) *J. Clin. Pathol.* 57(9):912-917; Kipriyanov *et al.* (2004) *Mol. Biotechnol.* 26(1):39-60; Fischer *et al.* (2003) *Vaccine* 21(7-8):820-825; Maynard *et al.* (2000) *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-376; Young *et al.* (1998) *Res. Immunol.* 149(6):609-610; y Hudson (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):395-402.

La producción de anticuerpos a través de cultivos celulares (por ejemplo, hibridomas) se ha descrito en, por ejemplo, Laffly *et al.* (2006), mencionado anteriormente; Aldington *et al.* (2007) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):64-78; S.S. Farid (2006) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):8-18; Birch *et al.* (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(5-6):671-685; Even *et al.* (2006) *Trends Biotechnol.* 24(3):105-108; Graumann *et al.* (2006) *Biotechnol. J.* 1(2):164-86; Patente de Estados Unidos N.º 7.112.439; y Publicaciones de Patente de Estados Unidos N.º 20070037216 y 20040197866.

Los anticuerpos pueden producirse a través de métodos de despliegue en fago, tales como los que se describen en, por ejemplo, Brinkman *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-86; Kettleborough *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-58; Persic *et al.* (1997) *Gene* 187:9-18; Burton *et al.* (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos N.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. La tecnología de presentación en fago también puede utilizarse para incrementar la afinidad de un anticuerpo con su antígeno. La tecnología, denominada como una maduración de afinidad, emplea mutagénesis o desplazamiento de CDR y re-selección utilizando el antígeno afín para identificar los anticuerpos que se unen con mayor afinidad con el antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o progenitor. Véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:3903; Wu *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton *et al.* (1995) *J. Immunology* 155:1994; Schier *et al.* (1996) *J. Mol. Bio.* 263:551.

Los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse a partir de una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, métodos de hibridomas como se describe en, por ejemplo, Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495; Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72; o Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Anticuerpos and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, o métodos de ADN recombinante como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567, o los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fago utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628 y Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597. Pueden utilizarse diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales con un antígeno de interés. Por ejemplo, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con el antígeno de interés o derivado del mismo que incluyen, pero sin limitación, conejos, ovejas, cabras, perros, ratones, ratas y conejillos de indias, y después de permitir una respuesta inmunológica, los anticuerpos pueden identificarse a partir del suero de los animales inmunizados.

Los anticuerpos biespecíficos también pueden generarse, por ejemplo a través de la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades, seguido por la purificación de la molécula deseada utilizando cromatografía por afinidad, como se describe en Milstein *et al.* (1983) *Nature* 305:537-39, documento WO 93/08829, Trautnecker *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-59. En un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos, con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina, por ejemplo con un dominio constante de cadena pesada, que comprende por lo menos parte de las regiones en bisagra, C_{H2} y C_{H3}. Los ácidos nucleicos que codifican estas fusiones pueden insertarse en el mismo vector de expresión o en uno distinto, y se expresan en un organismo hospedador adecuado.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, así como vectores que comprenden los polinucleótidos. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. En una realización, las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en este campo puede someterse a selección mediante técnicas convencionales conocidas en este campo, para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

B6. Caracterización de Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse en una diversidad de formas. En particular, los anticuerpos de la invención pueden someterse a prueba para detectar la capacidad de unirse de manera inmuno-específica con un antígeno, por ejemplo, HER2/neu, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o porción del mismo) para detectar la capacidad de mostrar interacciones Fc-FcγR, es decir una unión específica con un dominio Fc (o porción del mismo) con un FcγR. Tal ensayo puede realizarse en una solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-421), en microesferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), en microplacas (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), en bacterias (Patente de Estados Unidos N.º 5.223.409), en esporas (Patentes

De Estados Unidos N.º 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) Science 249:386-390; Devlin (1990) Science 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:6378-6382; y Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310). Las moléculas que se ha identificado que se unen de manera inmunoespecífica con un antígeno pueden someterse después a un ensayo para detectar su especificidad y afinidad para el antígeno.

Los inmunoensayos que pueden utilizarse para analizar la unión inmunoespecífica, reactividad cruzada e interacciones Fc-Fc γ R incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "intercalados", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina en difusión en geles, ensayos inmunocromatográficos, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinamiento, ensayos de fijación de complementos, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A, etc. (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, 2008, Current Protocols in Molecular Biology).

La afinidad de unión para un antígeno objetivo se mide o determina normalmente a través de ensayos de anticuerpos y antígenos convencionales, tales como ensayos competitivos Biacore, ensayos de saturación o inmunoensayos tales como ELISA o RIA.

Preferentemente, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), utilizando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la materia, se utiliza para ensayos inmunológicos o funcionales para caracterizar las moléculas de la invención. Los clasificadores de flujo son capaces de analizar con rapidez un gran número de células individuales que se han unido, por ejemplo, opsonizado, por moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora). De manera adicional, los parámetros específicos utilizados para la optimización del comportamiento de los anticuerpos, incluyen pero sin limitación concentración de antígeno, tiempo de competencia cinética o rigurosidad por FACS, cada uno de los cuales puede variar para seleccionar moléculas de anticuerpos que muestren propiedades de unión específicas. Se conocen bien en la técnica citómetros de flujo para clasificar y analizar células biológicas. Se describen citómetros de flujo conocidos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 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 Vantage™ para FACS comercializado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ comercializado por Union Biometrica.

Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmón superficial para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión con antígenos o unión de Fc-Fc γ R. Puede utilizarse cualquier método conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo, la tecnología descrita en, por ejemplo, Dong *et al.* (2002) Review in Mol. Biotech. 82:303-323; Mullet *et al.* (2000) Methods 22:77-91; Rich *et al.* (2000) Current Opinion in Biotechnology 11:54-61; Fivash *et al.* (1998) Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; y Patente de Estados Unidos N.º 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; y 6.268.125. Los datos se utilizan para representar las curvas de unión y determinar las constantes de los índices por ejemplo, K_{on} , K_{off} , y la constante K_d de unión de equilibrio aparente, por ejemplo como se describe en, por ejemplo, Myszkka (1997) Current Opinion in Biotechnology 8:50-57; O'Shannessy *et al.* (1996) Analytical Biochemistry 236:275-283; Morton *et al.* (1995) Analytical Biochemistry 227:176-185; Fisher *et al.* (1994) Current Opinion in Biotechnology 5:389-95; O'Shannessy (1994) Current Opinion in Biotechnology 5:65-71; y Chaiken *et al.* (1992) Analytical Biochemistry 201:197-210. En realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados utilizando un análisis de SPR pueden utilizarse como una medida para pronosticar como funcionará una molécula en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC.

La caracterización de la unión con Fc γ R por moléculas que comprende un dominio Fc (o porción del mismo) y/o comprende un dominio de unión de epítomos específico para un Fc γ R puede realizarse de acuerdo con los métodos descritos en la Técnica sobre Tecnología de Ingeniería de Anticuerpos. Los ensayos para las funciones de las células efectoras se conocen bien, por ejemplo, como se describe en Abdul-Majid *et al.* (2002) Scand. J. Immunol. 55:70-81; Perussia *et al.* (2000) Methods Mol. Biol. 121:179-192; Lehmann *et al.* (2000) J. Immunol. Methods 243(1-2):229-242; Ding *et al.* (1998) Immunity 8:403-411; Baggiolini *et al.* (1998) Experientia 44(10):841-848; Brown (1994) Methods Cell Biol. 45:147-164; y Munn *et al.* (1990) J. Exp. Med. 172:231-237.

Por ejemplo, los ensayos para fagocitosis mediada por Fc γ R pueden realizarse utilizando monocitos humanos, midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de ovejas opsonizados con IgG con fluorescencia (SRBC) mediante métodos descritos en lo anterior en Tridandapani *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275:20480-20487, o utilizando un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) como se describe en Bedzyk *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264(3):1565-1569. Los métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica pueden utilizarse para caracterizar la unión de C1q y la intervención de citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) por moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (o porciones de los mismos). Por ejemplo, para determinar la unión de C1q, puede realizarse un ELISA de unión con C1q, y para valorar la activación con complementos, puede realizarse un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.* (1996) J. Immunol. Methods 202:163.

En otra realización, las moléculas de la invención pueden someterse a prueba para detectar la actividad de ADCC mediada por Fc γ R en las células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, que con el uso de cualquiera

de los métodos convencionales por los expertos en la técnica y descritos en, por ejemplo, Weng *et al.* (2003) J. Clin. Oncol. 21:3940-3947; Perussia *et al.* (2000) Methods Mol. Biol. 121:179-192; Ding *et al.* (1998) Immunity 8:403-411. En una realización preferida específica, se utiliza un ensayo fluorimétrico resuelto en el tiempo para medir la actividad de ADCC contra células objetivo etiquetadas con fluorescencia, como se describe en, por ejemplo, Blomberg *et al.* (1996) Journal of Immunological Methods 193:199-206. Las células objetivo utilizadas en los ensayos de ADCC de la invención incluyen, pero sin limitación, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con un número de registro de ATCC HTB-30 (Trempe *et al.* (1976) Cancer Res. 33:41); linfocitos B; células derivadas del linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con un número de registro de ATCC de CCL-86 (Epstein *et al.* (1965) J. Natl. Cancer Inst. 34:231-240), y células Daudi con número de registro de ATCC CCL-213 (Klein *et al.* (1968) Cancer Res. 28: 1300-1310). Las células objetivo deben reconocerse por el sitio de unión con antígenos de la molécula que se someten a prueba. Preferentemente, las células efectoras utilizadas en los ensayos de ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y preferentemente se purifican a partir de sangre humana normal, utilizando métodos convencionales conocidos por una persona con experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque.

15 C. Métodos De Tratamiento y Composiciones Farmacéuticas

La administración de las composiciones (por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos) de la presente invención puede ser para un fin "profiláctico" o "terapéutico", o de manera alternativa puede utilizarse para fines de diagnóstico. Se dice que las composiciones de la presente invención se administran para un fin "terapéutico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar una terapia para una manifestación real de una enfermedad. Cuando se proporciona de forma terapéutica, el compuesto se proporciona preferentemente al identificar (o poco después de identificar) un síntoma de enfermedad real. La administración terapéutica del compuesto sirve para atenuar la gravedad de tal enfermedad o para invertir su avance. Se dice que las composiciones de la presente invención se administran para un fin "profiláctico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar una terapia para una posible enfermedad o afección. Cuando se proporciona de manera profiláctica, el compuesto se proporciona preferentemente antes de cualquier síntoma de los mismos. La administración profiláctica del compuesto sirve para prevenir o atenuar cualquier avance o recaída posterior de la enfermedad.

Proporcionar una terapia o "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejora de una lesión, patología o afección, que incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como reducción, remisión, disminución de síntomas o hacer más tolerable la lesión, patología o afección para el paciente, ralentizar la velocidad de degeneración o decaimiento, hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante o mejorar en bienestar físico o mental de paciente. El tratamiento o mejora de síntomas puede utilizarse con base en los parámetros objetivos o subjetivos, que incluyen los resultados de un análisis físico, análisis neuropsiquiátricos y/o una evaluación psiquiátrica.

Los objetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, con mayor preferencia especies de mamíferos tales como seres humanos u otros primates y animales domésticos tales como perros, gatos y similares, que padezcan una enfermedad u otras afecciones patológicas. Un "paciente" se refiere a un sujeto, preferentemente un mamífero (que incluye seres humanos).

Ciertas realizaciones de la presente invención se relacionan con composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes terapéuticos, y métodos para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos, que pueden utilizarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos. La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que tiene un efecto terapéutico para tratar de manera profiláctica o terapéutica un trastorno. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, así como otros agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con, o junto con, un anticuerpo o polipéptido. En una realización preferida, el agente terapéutico es un anticuerpo de la presente invención, y preferentemente es un fragmento de anticuerpo, un diacuerpo, un DART similar a Ig o una proteína de fusión.

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por el Fc γ R (por ejemplo, cáncer, enfermedades infecciosas). Por ejemplo, las moléculas de la invención pueden unirse con un antígeno de la superficie celular y un Fc γ R (por ejemplo, Fc γ RIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, célula NK), que estimula una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula. En algunas realizaciones, los anticuerpos y polipéptidos de la invención son adecuados en especial para el tratamiento de cánceres. La eficacia de la terapia con anticuerpos monoclonales convencionales depende del polimorfismo de Fc γ R del sujeto. Carton *et al.* (2002) Blood 99:754- 758; Weng *et al.* (2003) J Clin Oncol. 21(21):3940-3947. Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras e intervienen en el ADCC. Los alelos de alta afinidad mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar ADCC. Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden comprender un dominio Fc variante que muestra afinidad mejorada con Fc γ R (en relación con un dominio Fc natural) en células efectoras, lo que proporciona de esta manera mejores reactivos para inmunoterapia para pacientes sin importar su polimorfismo de Fc γ R.

Para propósitos de diagnóstico, los anticuerpos o polipéptidos pueden acoplarse a sustancia detectable, de modo

que puedan utilizarse, por ejemplo, para supervisar el desarrollo o avance de una enfermedad, trastorno o infección. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano, beta-galactosidasa, etc.), grupos prostéticos (por ejemplo, avidina/biotina), materiales fluorescentes (por ejemplo, umbeliferona, fluoresceína, o ficoeritrina), materiales luminiscentes (por ejemplo, luminol), materiales bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa o aequorina), materiales radiactivos (por ejemplo, carbono-14, manganeso-54, estroncio-85 o zinc-65), metales que emiten positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse de manera directa con las moléculas de la invención o de manera indirecta a través de un intermediario (por ejemplo, un enlazador), utilizando métodos conocidos en la técnica.

C1. Trastornos Tratables

Los trastornos ejemplares que pueden tratarse mediante diversas realizaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, trastornos proliferativos, trastornos proliferativos celulares, y cáncer, y enfermedades infecciosas. En diversas realizaciones, la invención abarca métodos y composiciones para el tratamiento, prevención o gestión de una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más moléculas (anticuerpos o polipéptidos) que se unen con un antígeno de la enfermedad. Por ejemplo, las moléculas de la invención son en particular útiles para la prevención, inhibición, reducción de crecimiento o regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerígenas y enfermedades infecciosas. Aunque no se pretende que esté limitado por un mecanismo de acción particular, las moléculas de la invención intervienen en las funciones efectoras, lo que da como consecuencia la eliminación del tumor, la reducción del tumor o una combinación de las mismas. En realizaciones alternativas, los anticuerpos de la invención intervienen en la actividad terapéutica al reticular los antígenos y/o receptores de la superficie celular y apoptosis mejorada o señalización negativa reguladora de crecimiento.

Los anticuerpos con una afinidad disminuida para FcγRIIB y una afinidad incrementada para FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden producir una respuesta de activación mejorada al unirse con FcγR y de esta manera, pueden tener una eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir el cáncer. Ejemplos no limitantes de cánceres tratables a través de los métodos en la presente memoria incluyen linfoma mieloide agudo, carcinoma adrenal, adenocarcinoma, cáncer basal, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, sarcoma de tejido óseo y conectivo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de bronquios, cáncer cervical, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer del endometrio, cáncer esofágico, cáncer de ojos, cáncer de las trompas de falopio, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gastrointestinal, glioma, leucemia de tricoleucitos, hepatoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de articulaciones, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, leucemia, cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica, linfoma, mesotelioma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer del oído medio, mieloma múltiple, mieloma, mixosarcoma, cáncer de las cavidades nasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de nariz, cáncer de la cavidad oral, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer peniano, cáncer del peritoneo, cáncer de faringe, cáncer de la glándula hipófisis, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de la glándula salivar, cáncer de la piel, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer tiroideo, cáncer urinario, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer testicular, cáncer vulvar y tumor de Wilm.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematopoyético o cáncer sanguíneo, tal como un linfoma, leucemia, mieloma, malignidad linfoide, cáncer del bazo y cáncer de los ganglios linfáticos. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer asociado con linfocitos B, tal como, por ejemplo, linfoma de grado alto, intermedio o bajo (que incluye linfoma de linfocitos B tal como, por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma de linfocitos B de tejido linfoide asociado con mucosa, linfoma no hodgkiniano, linfoma linfocítico pequeño y linfomas de linfocitos T) y leucemias (que incluyen leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de linfocitos B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielodisplasia, leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda, y leucemia secundaria), mieloma múltiple, tal como malignidad en las células plasmáticas, y otros cánceres hematológicos y/o relacionados con linfocitos B o T. Otros cánceres ejemplares son cánceres de células hematopoyéticas adicionales que incluyen leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y linfocitos citolíticos naturales.

En algunas realizaciones, el cáncer para tratar es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer del endometrio, carcinoma suprarrenal o cáncer de pulmón no microcítico. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama o cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer en el que se sobreexpresa HER2/neu. En una realización específica, un anticuerpo o polipéptido de la invención inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas por lo menos 99 %, por lo menos 95 %, por lo menos 90 %, por lo menos 85 %, por lo menos 80 %, por lo menos 75 %, por lo menos 70 %, por lo menos 60 %, por lo menos 50 %, por lo menos 45 %, por lo menos 40 %, por lo menos 35 %, por lo menos 30 %, por lo menos 25 %, por lo menos 20 % o por lo menos 10 % en relación con el crecimiento de las células cancerosas en ausencia de anticuerpo o polipéptido de la invención.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención son tóxicos para un agente infeccioso, mejoran la respuesta inmunitaria contra dicho agente o mejoran la función efectora contra dicha agente, en relación con la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante las moléculas de la invención son provocadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitación bacterias, hongos, protozoarios y virus. Ejemplos no limitantes de enfermedades bacterianas incluyen causadas por *Bacillus anthracis* (carbunco), *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Candida*, clamidia, cólera, difteria, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, legionella, micobacterium, micoplasma, *Neisseria*, pertussis, peste, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumonia*, *Salmonella*, estafilococos, estreptococos y tétanos. Enfermedades de protozoarios no limitantes incluyen aquellas provocadas por kokzidioa, leishmania, malaria o tripanosoma.

Ejemplos no limitantes de enfermedades virales incluyen aquellas provocadas por adenovirus, arbovirus, coronavirus, virus coxsackie, citomegalovirus, ébola, equinovirus, echovirus, endotoxina (LPS), enterovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, hepatitis murina), virus de herpes (por ejemplo, herpes simple tipo I (VHS-I), herpes simple tipo II (VHS-II), virus de herpes gamma murino), virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II), huntavirus, gripe, virus de leucemia (por ejemplo, leucemia murina, leucemia felina, etc.); virus del sarampión, virus de las paperas, virus de papiloma, virus de papova, virus de polio, virus sincitial respiratorio, retrovirus, rinovirus, peste bovina, rotavirus, virus de rubéola, viruela, virus linfotrópico de linfocitos T 1, vaccinia, varicela, y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, o dengue.

C2. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles y pueden incluir un portador y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo comprimidos, píldoras, polvos, grageas, bolsitas, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un medio sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina suave y rígida, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos comprimidos estériles, solo por nombrar algunas alternativas no limitantes. Tales composiciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido, por ejemplo, al combinar el principio activo con el portador o portadores o excipiente o excipientes en condiciones estériles.

Los principios activos también pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica. Las características físicas y químicas de las composiciones de la invención pueden modificarse u optimizarse de acuerdo con la experiencia en la técnica, dependiendo del modo de administración y la enfermedad o trastorno particular para tratar. Las composiciones pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria, un recipiente sellado o como parte de un equipo, que puede incluir instrucciones para su uso y/o una pluralidad de formas de dosificación unitaria.

En realizaciones particulares, los agentes terapéuticos pueden incorporarse en una composición, mediante, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (Véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. En otra realización particular, los agentes terapéuticos se aplican como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto.

Preferentemente, el agente terapéutico se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente en una unidad de dosificación de por lo menos 5 mg, con mayor preferencia por lo menos 10 mg, por lo menos 15 mg, por lo menos 25 mg, por lo menos 35 mg, por lo menos 45 mg, por lo menos 50 mg o por lo menos 75 mg. El polvo liofilizado debería almacenarse entre 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deberían administrarse por vía parenteral en un periodo de 12 horas, preferentemente 6 horas, 5 horas, 3 horas o 1 hora después de reconstituirse. En una realización alternativa, los agentes terapéuticos se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente terapéutico. Preferentemente, la forma líquida se suministra en un recipiente con sello hermético con por lo menos 1 mg/ml, con mayor preferencia por lo menos 2,5 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 8 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 15 mg/kg, por lo menos 25 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 100 mg/ml, por lo menos 150 mg/ml, por lo menos 200 mg/ml de las moléculas.

C3. Equipos

Las composiciones también pueden incluirse en un equipo. El equipo puede incluir, en aspectos no limitantes, una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico, instrucciones para administración y/u otros componentes. En realizaciones preferidas, el equipo puede incluir una composición lista para administración. Los recipientes de los equipos pueden incluir un frasco, dosificador, envase, compartimento u otros tipos de recipientes

en los cuales puede colocarse un componente. El recipiente puede incluir distintivos en su superficie. Los distintivos, por ejemplo, pueden ser una palabra, una frase, una abreviatura, una imagen o un símbolo. Los recipientes pueden dosificar una cantidad predeterminada del componente (por ejemplo, composiciones de la presente invención). La composición puede dosificarse en una pulverización, un aerosol o en forma líquida o forma semi-sólida. Los recipientes pueden tener mecanismos de pulverización, bombeo o compresión. En ciertos aspectos, el equipo puede incluir una jeringa para administrar las composiciones de la presente invención.

Cuando existe más de un componente en el equipo (estos pueden estar envasados juntos), el equipo también contendrá por lo general un segundo, tercer u otros recipientes adicionales en el que pueden colocarse por separado los componentes adicionales. Los equipos de la presente invención también pueden incluir un recipiente que albergue los componentes de forma muy reducida para su comercialización. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que quedan detenidos los frascos, dosificadores o envases deseados. Un equipo también puede incluir instrucciones para emplear los componentes del equipo, así como también el uso de cualquier otra composición, compuesto, agente, principio activo u objeto no incluido en el equipo. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir una explicación de cómo aplicar, usar y conservar los productos o las composiciones.

C4. Administración y Dosificación

Una diversidad de vías de administración para las composiciones de la presente invención se encuentran disponibles. El modo particular seleccionado dependerá, desde luego, del agente terapéutico particular seleccionado, ya sea si la administración es para prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, la gravedad del trastorno médico tratado y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención pueden practicarse utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable y produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos adversos inaceptables en términos clínicos. Tales modos de administración incluyen, pero sin limitación, metodología oral, bucal, sublingual, de inhalación, mucosa, rectal, intranasal, tópica, ocular, periocular, intraocular, transdérmica, subcutánea, intra-arterial, intravenosa, intra-muscular, parenteral o infusión. En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y sin limitación, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas elásticas o fibras.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo a un paciente, es decir, curar o aliviar afecciones crónicas, una reducción en los síntomas, un incremento de la rapidez de curación de tales afecciones o un cambio detectable en los niveles de una sustancia en el tejido tratado o circundante. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, la expresión se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que resultan en el efecto terapéutico, ya sea que se administren en combinación, en serie o de manera simultánea.

El programa de dosificación y cantidades eficaces para usos terapéuticos y profilácticos, es decir "régimen de dosificación", dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la etapa de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de la salud del paciente, el estado físico del paciente, edad y similares. La eficacia terapéutica y toxicidad de las composiciones puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. Por ejemplo, numerosos métodos para determinar DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 por ciento de la población) y DL_{50} (la dosis letal de 50 por ciento de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y este puede expresarse como la proporción DE_{50}/DL_{50} . Se prefieren las composiciones que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares o estudios en animales pueden utilizarse para formular una gama de dosificaciones para uso humano. La dosificación se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones que incluye la DE_{50} con toxicidad mínima o nula y puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente y la vía de administración.

El régimen de dosificación también considera los parámetros farmacocinéticos que se conocen bien en la técnica, es decir, la velocidad de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, eliminación y similares (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby (1996) Contraception 54:59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; el último Remington, mencionado anteriormente). El estado de la técnica permite que el médico determine el régimen de dosificación para cada paciente particular, el agente terapéutico y enfermedad o afección tratado. La administración única o múltiple de las composiciones de la presente invención puede administrarse dependiendo de la dosificación y frecuencia necesaria y tolerada por el paciente. La duración del tratamiento profiláctico y terapéutico variará dependiendo de la enfermedad o afección particular tratada. Algunas enfermedades se prestan a tratamiento de corta duración, mientras que otras requieren terapia a largo plazo. Si la administración no se realiza a diario, por ejemplo si se aplican inyecciones cada pocos

días, cada pocas semanas o cada pocos meses, entonces puede incluirse más agente terapéutico en cada administración, de modo que la liberación diaria del agente sea adecuada para satisfacer necesidades terapéuticas.

En una realización preferida, los agentes terapéuticos de la invención se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar dosificación en intervalos constantes sin periodos de descanso. Normalmente, los agentes terapéuticos, en particular agentes citotóxicos se utilizan en dosis más bajas. Tales regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante periodos de tiempo prolongados, que pueden minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. Kamat *et al.* (2007) *Cancer Research* 67:281-88. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos se liberan mediante infusión crónica de dosis bajas o continua que varían de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas, a aproximadamente 1 mes, a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. La programación de tales regímenes de dosificación puede optimizarse por un oncólogo con experiencia.

Para los anticuerpos que abarcan la invención, la dosificación administrada a un paciente es por lo general de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada al paciente es de 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. La dosificación y frecuencia de administración puede reducirse o alterarse potenciando la captación y penetración en el tejido de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación. En una realización, la dosificación de los anticuerpos administrados a un paciente es de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se utiliza como una terapia con un solo agente. En otra realización los anticuerpos se utilizan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es menor cuando dichas moléculas se utilizan como una terapia de un solo agente. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con anticuerpos en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, con mayor preferencia entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso con mayor preferencia durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas.

C5. Terapias de Combinación

La invención abarca además administrar los anticuerpos o polipéptidos de la invención en combinación con otras terapias conocidas para los expertos en la técnica para el tratamiento para o prevención de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamación o enfermedades infecciosas, que incluyen pero sin limitación, quimioterapias convencionales y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, terapias de radiación o cirugía. En algunas realizaciones, los anticuerpos o polipéptidos de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos conocidos para los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas o intoxicación.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “combinación” se refiere al uso de más de un agente terapéutico. El uso del término “combinación” no restringe el orden en el que se administran los agentes terapéuticos a un sujeto con un trastorno, ni significa que los agentes se administran exactamente al mismo tiempo, sino que significa que un anticuerpo o polipéptido de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo que el anticuerpo o polipéptido de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor del que brindarían si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o en serie en cualquier orden en diferentes puntos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deberían administrarse con una cercanía de tiempo suficiente para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada o mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, uno por vía oral y uno por vía parenteral.

En varias realizaciones, un primer agente terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 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), junto con o después de (por ejemplo, 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) de la administración de un segundo (o posterior) agente terapéutico a un sujeto con un trastorno. En realizaciones preferidas, dos o más agentes se administran dentro de la misma visita del paciente o con no más de 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia.

En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos se administran de manera cíclica a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un periodo, seguido por la administración de un segundo agente y/o tercer agente durante un periodo y repetir esta administración en secuencia. La terapia cíclica puede

reducir el desarrollo de resistencia a una o más terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejora la eficacia del tratamiento. Los ciclos ejemplares son aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas y aproximadamente una vez cada tres semanas. Cada ciclo puede comprender por lo menos 1 semana de descanso, por lo menos 2 semanas de descanso, por lo menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados va de aproximadamente 1 a alrededor 12 ciclos, con mayor frecuencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos y con mayor frecuencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

En una realización para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se conjuga, o administra en combinación con otro agente terapéutico, tal como, pero sin limitación, un agente alquilante (por ejemplo, mecloretamina o cisplatino), inhibidor de angiogénesis, antraciclina (por ejemplo, daunorubicina/daunomicina o doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina o antramicina), anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF tal como bevacizumab (comercializado como AVASTIN® por Genentech, Inc.), un anticuerpo anti-EGFR tal como panitumumab (comercializado como VECTIBIX™ por Amgen, Inc.) o un anticuerpo anti-integrina tal como natalizumab (comercializado como TYSABRI® por Biogen Idec y Elan Pharmaceuticals, Inc.), un antimetabolito (por ejemplo, metotrexato o 5-fluorouracilo), un agente anti-mitótico (por ejemplo, vincristina o paclitaxel), una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente de terapia hormonal (por ejemplo, un modulador de receptores de estrógenos selectivo (por ejemplo, tamoxifeno o raloxifeno), inhibidores de aromataza, análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante, agente progestacional, adrenocorticosteroides, estrógenos, andrógenos, agentes anti-estrógenos, agentes de bloqueo de receptores de andrógenos, inhibidores de 5-alfa reductasa, inhibidor de la producción suprarrenal, etc.), un inhibidor de metaloproteasa de matriz, un elemento radiactivo (por ejemplo, alfa-emisores, gamma-emisores, etc.), o cualquier otro agente quimioterapéutico.

Ejemplos no limitantes de inhibidores de angiogénesis adecuados incluyen ABT-627; angiostatina (fragmento de plasminógeno); angiozima; antitrombina antiangiogénica III; Bay 12-9566; benefina; bevacizumab; BMS-275291; bisfosfonatos; inhibidor derivado de cartilago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; endostatina (fragmento de colágeno XVIII); inhibidores de farnesil transferasa (FTI); fragmento de fibronectina; gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferones (IP-10); interleucina-12; kringle 5 (fragmento plasminógeno); marimastat; inhibidores de metaloproteína (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; neovastat; NM-3; panzem; PI-88; inhibidor de ribonucleasa placentaria; inhibidor de activadores plasminógenos; factor-4 de plaquetas (PF4); prinomastat; fragmento de prolactina de 16kDa; proteína relacionada con proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; solimastat; esualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; trombospondina-1 (TSP-I); TNP-470; factor beta de crecimiento transformante (TGF- β); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; y ZD 6474.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos adicionales para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluye anticuerpos para 17-1A, $\alpha\beta$ 3, AFP, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, Proteínas asociadas con ADN, Receptor EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-I, nuC242, antígeno PEM, antígeno SK-I, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF.

En una realización diferente, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, tal como, pero sin limitación, anticuerpos, agentes anticolinérgicos, beta-agonistas, metil xantinas, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, celecoxib o diclofenaco), y fármacos anti-inflamatorios esteroideos (por ejemplo, glucocorticoides, dexametasona, cortisonas, prednisona o eicosanoides). Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de un enfermedad inflamatoria, tal como, pero sin limitación anticuerpos para alfa4beta7, beta2-integrina, CBL, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD11/18, CD14, CD18, CD23, CD25, CD40L, CD64 (FcR), CD80, CD147, Complemento (C5), E-selectina, Fact VII, gpIIb/IIIa, ICAM-3, IgE, IL-4, IL-5, IL-8, TNF-alfa y VLA-4.

En una realización adicional, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, tal como, pero sin limitación, anticuerpos, brequinar, ciclofosfamida, ciclosporina A, moduladores de receptores de citoquina, desoxispermualina, leflunomida, antibióticos de macrólidos, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), metotrexato, metilprednisolona, mizoribina, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), esteroides, y moduladores de receptores de linfocitos T. Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de un trastorno autoinmune y ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos para receptores de integrina α 4 β 7, antígenos CBL, CD2, CD4, CD23, CD40, CD80, FcRI, Interferón gamma, IL-8, inosina monofosfato dehidrogenasa, ICE interleucina-1 beta, P38MAP quinasa, y TNF.

En aún otra realización, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, tal como, pero sin limitación, un antibiótico, anti-fúngico o agente anti-viral. Los antibióticos que pueden utilizarse en combinación con

las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación, 2,4 diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, neomicina o espectinomicina), amfenicoles (por ejemplo, cloramfenicol), anfomicinas, ansamicinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), bacitracinas, carbacefemos (por ejemplo, loracarbef), carbapenemos (por ejemplo, biapenemo e Imipenemo), cefalosporinas (por ejemplo, cefalexina o cefadroxil), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), claritromicinas, eritromicinas, lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), macrólidos (por ejemplo, tobramicina), monobactams (por ejemplo, carumonam), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, y cloruro de furazolio), oxacefems (por ejemplo, flomoxef y moxalactam), penicilinas, quinolonas (por ejemplo, ofloxacina o ciprofloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, benzilsulfamida, y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), y tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina y clortetraciclina).

Los agentes antifúngicos que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación, anfotericina B, butoconazol, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, haloprogrina, intratecal, itraconazol, ketoconazol, miconazol, naftifina, nistatina, terbinafina, terconazol, tioconazol y undecilenato. Los agentes antivirales útiles que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación, inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos, análogos de nucleósidos, inhibidores de transcriptasa inversa nucleósidos e inhibidores de proteasa. Son ejemplos no limitantes de tales agentes aciclovir, adefovir, interferones alfa, amantadina, amprenavir, clevadina, entecavir, foscarnet, gangciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina y zidovudina.

C6. Demostración de Utilidad Terapéutica

Las composiciones farmacéuticas, agentes profilácticos y terapéuticos de la invención se prueban preferentemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular y en un organismo de modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, con respecto a la actividad terapéutica deseada antes de usarse en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden utilizarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica es deseable, incluyen ensayos en cultivos celulares en los que la muestra tisular de un paciente crece en cultivo y se expone a o de otro modo se pone en contacto con una composición farmacéutica de la invención y se observa el efecto de tal composición en la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la molécula o moléculas profilácticas o terapéuticas más eficaces en términos terapéuticos para cada paciente particular. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipo celulares involucrados con un trastorno autoinmune o inflamatorio (por ejemplo, células T) para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado en tales tipos celulares.

Los sistemas de modelo animal adecuados incluyen, pero sin limitación, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede utilizarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En una realización específica de la invención, las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos se ponen a prueba en un sistema de modelo de ratón. Los modelos animales preferidos para su uso en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en Patente de Estados Unidos 5.877.396 puede utilizarse en la presente invención.

La actividad anti-inflamatoria puede determinarse utilizando diversos modelos de animales experimentales y espontáneos 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 *et al.* (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Por ejemplo, los modelos de artritis inducidos por adyuvantes tales como artritis inducida por carragenano, ximosano o colágeno en ratas, hámsteres, conejos, perros y cerdos son útiles para estudiar la actividad inflamatoria y la inhibición de los edemas de las patas inducidos por carragenano en ratas es una selección principal *in vivo* para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE y se considera un pronóstico de la eficacia en seres humanos. Estos modelos se describen en, por ejemplo, Winter *et al.* (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:544-47; y Hansra *et al.* (2000) *Inflammation* 24(2):141-55. Los modelos animales para la enfermedad inflamatoria del intestino también pueden utilizarse para valorar la eficacia de las terapias de la invención, por ejemplo, los modelos descritos en, por ejemplo, Strober (1985) *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Supl):3S-10S; Kim *et al.* (1992) *Scand. J. Gastroenterol.* 27:529-37). En estos modelos, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn pueden inducirse en animales a través de la administración oral de polisacáridos sulfatados, sulfato de dextrano o irritantes químicos.

La eficacia del tratamiento de trastornos autoinmunitarios puede valorarse utilizando modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como diabetes tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus sistémico eritematoso y glomerulonefritis, por ejemplo los modelos descritos en Flanders *et al.* (1999) *Autoimmunity* 29:235-46; Krogh *et al.* (1999) *Biochimie* 81:511-15; Foster (1999) *Semin. Nephrol.* 19:12-24, etc.

La actividad anti-cancerígena de los agentes terapéuticos también puede determinarse utilizando diversos modelos animales experimentales para el estudio de cáncer, tal como el modelo de ratón SCID, ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos y otros modelos animales tales como hámsteres, 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). Los modelos animales preferidos son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas celulares tumorales que pueden utilizarse como una fuente para tumores de xenoinjerto incluyen pero sin limitación, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores erbB2 y prolactina. Las células SKBR3 se han utilizado con frecuencia en la técnica como modelos tumorales de ADCC y xenoinjertos. De manera alternativa, las células OVCAR3 derivadas de adenocarcinoma ovárico humano pueden utilizarse como una fuente de tumores de xenoinjertos.

Los agentes terapéuticos de la invención se ponen a prueba preferentemente *in vitro*, y luego *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes y métodos terapéuticos pueden seleccionarse utilizando células de un tumor o línea celular maligna. Muchos ensayos convencionales en la técnica pueden utilizarse para valorar tal supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ponerse a prueba midiendo la incorporación de ³H-timidina mediante el recuento celular directo, detectando cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede valorarse mediante tinción con azul de tripano, la diferenciación puede valorarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, el crecimiento disminuido y/o formación de colonias en agar blando o una formación en redes tubulares en la membrana basal tridimensional o preparación de matrices extracelulares, etc.

Los datos obtenidos de los ensayos en cultivos celulares y estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificaciones de los agentes terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes queda preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con baja o nula 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 utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse de manera inicial a partir de los ensayos en cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para obtener un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en un cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento.

D. Otros Métodos

D1. Terapia Génica

En una realización específica, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican moléculas de la invención, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o proteína de fusión que interviene en un efecto terapéutico o profiláctico. Puede utilizarse cualquier método para terapia génica disponible en la técnica, por ejemplo los métodos descritos en, por ejemplo, Goldspiel *et al.* (1993) *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu (1991) *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev (1993) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) *Science* 260:926-932; y Morgan and Anderson (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217.

En un aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, diacuerpo o proteína de fusión de la invención, formando tales ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un hospedador adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, ligados de manera operativa a la región de codificación de anticuerpos, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, de manera opcional, específico para un tejido. En otra realización particular, se utilizan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias de codificación de anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, con lo que se proporciona una expresión intracromosómica del anticuerpo que codifica ácidos nucleicos, como se describe en Koller y Smithies (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 86:8932-35; y Zijlstra *et al.* (1989) *Nature* 342:435-38.

La liberación de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser ya sea directa, en cuyo caso, los sujetos se exponen de manera directa al ácido nucleico o vectores que transportan el ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro* y luego se transplantan el sujeto. Estos dos enfoques se conocen, de manera respectiva, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se administra *in vivo*, donde se expresa para producir el polipéptido codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de numerosos métodos, tales como infección utilizando retrovirales u otros vectores virales (como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 4.980.286; Miller *et al.* (1993) *Meth. Enzymol.* 217:581-599; Salmons y

Gunzberg (1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141; Grossman y Wilson (1993) *Curr. Opin. in Genetics y Devel.* 3:110-114; Kozarsky y Wilson (1993) *Current Op. in Genetics and Dev.* 3:499-503; Walsh *et al.* (1993) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300; Bout *et al.* (1994) *Human Gene Therapy* 5:3-10; Boesen *et al.* (1994) *Biotherapy* 6:291-302; Clowes *et al.* (1994) *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein *et al.* (1994) *Blood* 83:1467- 1473; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.436.146), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en combinación con un péptido que se sabe que entra en el núcleo o en combinación con un antígeno sujeto a endocitosis mediada por receptores (como se describe en, por ejemplo, Wu y Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432; Joliot *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 88:1864-1868; documentos WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; WO 93/20221) (que puede utilizarse para dirigir tipos celulares que expresan de manera específica los receptores), etc.

Puede introducirse un ácido nucleico en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante, por ejemplo, como se describe en el documento WO 94/08598; Rheinwald (1980) *Meth. Cell Bio.* 21A:229; Pittelkow y Scott (1986) *Mayo Clinic Proc.* 61:771; Stemple y Anderson (1992) *Cell* 7 1:973-985. Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un sujeto a través de diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células que se pretende utilizar depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede determinarse por una persona con experiencia en la técnica. Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular deseado y disponible e incluyen pero sin limitación células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular, células madres o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, las que se obtienen de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical, la sangre periférica, hígado fetal, etc. En una realización preferida la célula utilizada para terapia génica es autóloga al sujeto.

D2. Terapia con Vacunas

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, que incluye pero sin limitación antígenos de cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas. Las composiciones de vacunas de la invención comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos para los que se desea una respuesta inmune, en donde uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos se recubren con un anticuerpo de la invención. Las composiciones de vacunas de la invención son en particular eficaces para desencadenar una respuesta inmune, preferentemente una respuesta inmune de protección contra el agente antigénico o inmunogénico, que puede ser un virus contra el cual se desea obtener una respuesta inmune, o un antígeno derivado de otro patógeno viral o no viral.

En aún otra realización, la invención abarca células patógenas o virus, preferentemente, virus atenuados, que expresan el anticuerpo en su superficie. La invención abarca además métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición de la invención. Preferentemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo de la invención.

D3. Direccionamiento de liposomas u otros microportadores y nanoportadores

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para preparar liposomas dirigidos para suministrar una composición terapéutica deseada (por ejemplo, agentes anti-cáncer) a una célula objetivo (por ejemplo, una célula de cáncer de próstata u otra célula que exprese HER2/neu). La preparación y uso de inunoliposomas para la liberación dirigida de fármacos antitumorales se revisa en Mastrobattista *et al.* (1999) *Advanced Drug Delivery Reviews* 40:103-127. Los liposomas son estructuras vesiculares que tienen una base de bicapas lipídicas. Estos pueden tener un tamaño tan pequeño como 20 nm y tan grande como 10 µm de diámetro. Estos pueden ser unilamelares (solo una bicapa rodea un núcleo acuoso) o multilamelares (dos o más bicapas de orientación concéntrica alrededor de un núcleo acuoso). El direccionamiento de liposomas con el uso de una diversidad de agentes de dirección (por ejemplo, anticuerpos de la invención) se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes De Estados Unidos N.º 4.957.773 y 4.603.044. Pueden utilizarse métodos convencionales para acoplar agentes de dirección a liposomas. Los liposomas dirigidos a anticuerpos pueden construirse utilizando, por ejemplo, liposomas que incorporan la proteína A. Véase Renneisen *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:16337-16342 y Leonetti *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 87:2448-2451.

En una realización preferida, los liposomas se forman a partir de lípidos que forman vesículas convencionales, que por lo general incluyen fosfolípidos y un esteroles con carga negativa y neutra, tal como el colesterol. La selección de lípidos por lo general se guía por consideración, por ejemplo, del tamaño del liposoma y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Una diversidad de métodos se encuentran disponibles para preparar liposomas, como se describen en, por ejemplo, Szoka, *et al.* (1980) *Am. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; las Patentes De Estados Unidos N.º 4.235.871; 4.501.728 y 4.837.028. Un método produce vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos que forman vesículas se disuelven en un disolvente orgánico adecuado o sistema de

disolventes y se secan al vacío o con un gas inerte, para formar una película lipídica delgada. Si se desea, la película puede redisolverse en un disolvente adecuado, tal como el butanol terciario, y luego puede liofilizarse para formar una mezcla lipídica más homogénea que se encuentra en una forma similar al polvo que puede hidratarse con mayor facilidad. Esta película se cubre con una solución acuosa del fármaco objetivo y el componente de dirección (anticuerpo) y se deja hidratar, por lo general durante un período de 15-60 minutos con agitación. La distribución del tamaño de las vesículas multilamelares resultantes puede desplazarse hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosa o añadiendo detergentes solubilizantes tales como desoxicolato.

D4. Inmunoensayos

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar HER2/neu, o células que expresan HER2/neu. Cualquiera de varios métodos puede utilizarse para obtener tal detección. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos de unión inmunológica (véase, por ejemplo, las Patentes De Estados Unidos N.º 4.366.241, 4.376.110, 4.517.288 y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos en general, véase también Asai (ed. 1993) *Methods in Cell Biology* Vol. 37, Academic Press, Nueva York; Stites y Terr (eds. 1991) *Basic and Clinical Immunology* 7ª Ed.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para detectar células que expresan HER2/neu. En un método, se realiza una biopsia en el sujeto y el tejido recolectado se somete a prueba *in vitro*. El tejido o células del tejido se ponen en contacto después con un anticuerpo anti-HER2/neu de la invención. Cualquier complejo inmune cuyo resultado indique la presencia de una proteína HER2/neu en la muestra de la biopsia. Para facilitar tal detección, el anticuerpo puede radiomarcarse o acoplarse con una molécula efectora que es un marcador detectable, tal como un radiomarcador. En otro método, las células pueden detectarse *in vivo* utilizando sistemas de generación de imágenes convencionales. De este modo, la localización del marcador se determina a través de cualquiera de los métodos conocidos para detectar el marcador. Puede utilizarse un método convencional para visualizar la imagen de diagnóstico. Por ejemplo, pueden utilizarse isótopos paramagnéticos para MRI. La internalización del anticuerpo puede ser importante para prolongar la vida dentro del organismo más allá de la proporcionada por la unión extracelular, que puede ser susceptible a eliminación por el ambiente enzimático extracelular, junto con la eliminación circulatoria.

Las proteínas HER2/neu también pueden detectarse utilizando métodos de inmunoensayo convencional y los anticuerpos de la invención. Los métodos convencionales incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, métodos inmunocromatográficos, inmunoensayos de intercalación (que incluyen ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, transferencia Western, cromatografía por afinidad (ligando de afinidad unido a una fase sólida), y detección *in situ* con anticuerpos marcados.

Habiendo descrito ahora la invención en general, la misma se comprenderá con mayor facilidad a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limite la presente invención a menos que se especifique.

EJEMPLO 1

Determinación de Afinidad por BIAcore

Los parámetros cinéticos de la unión de anticuerpos eluidos y purificados se analizaron utilizando un ensayo de BIAcore (instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ.) y software asociado. El HER-2 se inmovilizó en una de las cuatro celdas de flujo (celda de flujo 2) de una superficie con microplacas sensoras a través de química de acoplamiento de aminas (mediante modificación de grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de modo que aproximadamente 1000 unidades de respuesta (UR) del receptor se inmovilizaron en la superficie. Después de esto, los ésteres activos sin reaccionar se "finalizaron" con una inyección de Et-NH₂ 1M. Una vez preparada una superficie adecuada, se inyectó ch4D5-FcWT (Fc natural), ch4D5 y trastuzumab (control) a concentraciones de 6,25-200 nM sobre la superficie, a un caudal de 70 ml/min durante 180 segundos.

Una vez recopilado el conjunto de datos completos, las curvas de unión resultantes se ajustaron de manera global y las constantes del índice y la constante de unión de equilibrio aparente se calcularon utilizando algoritmos informáticos proporcionados por el fabricante, según se describe en el Manual de Usuario del Software BIAevaluation, disponible por BIAcore, Inc. La **Figura 3** muestra los resultados gráficos del análisis de SPR, y las constantes calculadas se proporcionan en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Constantes Cinéticas y de Equilibrio Calculadas a partir de los Datos de BIAcore			
Analito	Ka1 (1/mol*s)	Kd1 (1/s)	K _D (nM)
Fc natural ch4D5	1,7 x 10 ⁵	~3,2 x 10 ⁻⁷ (est.)	--
ch4D5	1,1 x 10 ⁵	~6,3 x 10 ⁻⁶ (est.)	--
trastuzumab	1,6 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁻⁴	0,8

EJEMPLO 2**Apoptosis**

Diversas líneas celulares se incubaron durante la noche con ch4D5 y ch4D5-FcMT1. La apoptosis se sometió a ensayo mediante análisis de FACS, y los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

5

Tabla 6				
	Experimento 1		Experimento 2	
Líneas Celulares	ch4D5	ch4D5 FcMT1	ch4D5	ch4D5 FcMT1
SKBR3	35%	30%	15%	10%
JIMT	10%	10%	12-30%	10-30%
BT474	0	0	0	0
MCF-7	0	0	0	0
MDA MB 435	0	0	0	0
MDA MB 468	10%	10%	5%	0
MDA MB 361	0	0	12%	10%
MDA MB 453	20%	20%	20%	20%
MDA MB 231	0	0	0	0
ZR-75-1	0	0	0	0
A549	0	0	0	0
SKOV3	0	0	0	0
HT-29	0	0	0	0
OVCAR-3	10%	14%	5%	19%
OVCAR-8	0	0	0	0
BT-20	12%	10%	20%	15%

EJEMPLO 3**Proliferación**

- 10 Se utilizó la incorporación de [³H]timidina ([³H]TdR) en ADN en un índice bioquímica de proliferación celular SKBR3, para comparar los efectos de diversos anticuerpos 4D5 quiméricos de las presentes realizaciones. El efecto de ch4D5-Ag, ch4D5 y Ch4D-FcMT1 en CD16-158F+ y CD16-158V+ se estudió y comparó con los controles. Los resultados se representan en la Figura 4.

EJEMPLO 4**Actividad Anti-Tumoral en Ratones (Modelo de Cáncer de Mama)**

- La actividad anti-tumoral de diversos anticuerpos se estudió en un modelo de cáncer de mama utilizando ratones transgénicos y no transgénicos (hCD16A). Se inyectaron a cincuenta ratones Balb/c RAG2-/- no transgénicos de la colonia de reproducción MacroGenics sc en el día 0 células de cáncer de mama JMT-1. Los ratones se dividieron en cinco grupos de 10 ratones cada uno, y se trataron de manera intraperitoneal (IP) semanalmente durante 8 semanas con ch4D5 N297Q, ch4D5-Fc natural, ch4D5-FcMT1, ch4D5-FcMT2 o PBS (control negativo). El desarrollo de tumores se supervisó dos veces por semana, utilizando calibradores, y el peso tumoral se calculó mediante la siguiente fórmula: peso del tumor = (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la **Figura 5**. Se inyectaron a veintitrés ratones Balb/c RAG2-/- mCD16-/-hCD16A+ transgénicos de la colonia de reproducción de MacroGenics s.c. en el día 0 células de cáncer de mama JIMT-1. Los ratones se dividieron en tres grupos, y se trataron por vía intraperitoneal (IP) semanalmente durante 8 semanas con Fc natural-ch4D5 (n= 8), ch4D5-FcMT1 (n=8) o PBS (control negativo, n=7). El desarrollo de los tumores se supervisó dos veces por semana, utilizando calibradores, y el peso de los tumores se calculó mediante la siguiente fórmula: peso del tumor = (longitud x altura²)/2. Los resultados se muestran en la **Figura 6**.

EJEMPLO 5**Actividad Anti-tumoral en Ratones (Modelo de Cáncer Ovárico)**

La actividad anti-tumoral de diversos anticuerpos se estudió en un modelo de cáncer ovárico utilizando ratones no transgénicos y transgénicos (hCD16A). Se inyectaron a 22 ratones R3-/- N/N no transgénicos de la colonia de reproducción MacroGenics s.c. en el día 0 células de cáncer ovárico SKOV-3. Los ratones se dividieron en cuatro grupos, y se trataron por vía intraperitoneal (IP) semanalmente durante 8 semanas con ch4D5 N297Q (n=5), Fc natural-ch4D5 (n=6), ch4D5 – FcMT1 (n=6) o PBS (control negativo; n=5). El desarrollo de los tumores se supervisó dos veces por semana, utilizando calibradores, y el tamaño del tumor se calculó a través de la siguiente fórmula: peso del tumor = (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la **Figura 7, Panel A**. Se inyectaron a 32 ratones R3-/- N/N hCD16A+ transgénicos de la colonia de reproducción MacroGenics s.c. en el día 0 células de cáncer ovárico SKOV-3. Los ratones se dividieron en cuatro grupos, y se trataron por vía intraperitoneal (IP) semanalmente durante 8 semanas con ch4D5 N297Q (n=8), Fc natural-ch4D5 (n=8), ch4D5-FcMT1 (n=8) o PBS (control negativo, n=8). El desarrollo del tumor se supervisó dos veces por semana, utilizando calibradores, y el peso del tumor se calculó mediante la siguiente fórmula: peso del tumor = (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la **Figura 7, Panel B**. Se inyectaron a 96 ratones mCD16-/-huCD16A FoxN1-/- (nu/nu) transgénicos de la colonia de reproducción MacroGenics s.c. en el día 0 células de cáncer ovárico SKOV-3. Los ratones se dividieron en seis grupos de 16 ratones cada uno, y se trataron por vía intraperitoneal (IP) semanalmente durante 8 semanas con ch4D5-FcMT3, ch4D5-FcMT1, ch4D5-FcMT4, ch4D5, ch4D5Ag o PBS (control negativo). El desarrollo de tumores se supervisó dos veces por semana, utilizando calibradores, y el peso del tumor se calculó mediante la siguiente fórmula: peso del tumor = (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la **Figura 8**.

EJEMPLO 6:**Análisis de ADCC en Diversas Líneas celulares Cancerosas**

La **Figura 9** ilustra la tinción inmunohistoquímica representativa de diversas líneas celulares cancerosas para HER2/neu. Las líneas celulares se clasificaron de acuerdo su intensidad de tinción de HER2/neu como se especifica en el equipo de prueba HER2/neu comercializado como DAKO HerceptTest™ (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca): tinción de HER2/neu ausente (puntuación DAKO 0); tinción de HER2/neu débil (puntuación DAKO + 1); tinción de HER2/neu moderada (puntuación DAKO 2+) y tinción de HER2/neu fuerte (puntuación DAKO 3+). Los diversos paneles representan las diversas líneas celulares, como se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7: tinción de DAKO de varias líneas celulares de la Figura 9

Panel	Línea Celular	Descripción	Sitios/Célula	Puntuación
A	MDA-MB-435	Carcinoma de mama	$4,7 \times 10^3$	0
B	MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	$1,6 \times 10^4$	0
C	A549	Adenocarcinoma de pulmón	$3,4 \times 10^4$	1+
D	OVCAR-8	Carcinoma Ovárico	$4,4 \times 10^4$	1+
E	MCF-7	Adenocarcinoma de mama	$4,5 \times 10^4$	1+
F	BT-20	Carcinoma Ductal	$6,9 \times 10^4$	1+
G	HT-29	Cáncer de colon/colorrectal	$9,4 \times 10^4$	1+
H	ZR75-1	Carcinoma ductal	$1,4 \times 10^5$	2+
I	JIMT-1	Carcinoma de mama	$2,0 \times 10^5$	2+
J	MDA-MB-453	Carcinoma de mama	$2,8 \times 10^5$	3+
K	BT-474	Carcinoma ductal	$2,0 \times 10^6$	3+
L	SKBR-3	Carcinoma de mama	$3,0 \times 10^6$	3+
M	mSKOV-3	Cáncer ovárico	$4,0 \times 10^6$	3+

Varios anticuerpos ch4D5 incluyendo anticuerpos ch4D5 con dominios variantes de Fc se sometieron a prueba para detectar la estabilidad para intervenir en la ADCC en las líneas celulares cancerosas, incluyendo ch4D5-FcMT1, ch4D5-FcMT2, ch4D5-FcMT3, ch4D5-FcWT (Fc natural), ch4D5 N297Q y trastuzumab (como control). Se presentan datos de ensayos válidos (SR ≤ 20 % MR, AICC ≤ 50 % MR) en la **Tabla 8**, donde las estimaciones de CE₅₀ se

consideraron válidas solo si el modelo se ajustaba a una lisis máxima >20 %. La comparación de CE₅₀ y los parámetros de lisis máxima se realizó preguntando si los mejores valores de ajuste obtenidos para los anticuerpos optimizados para Fc eran estadísticamente diferentes de los obtenidos para el anticuerpo ch4D5 natural de Fc mediante la prueba F de suma de cuadrados. Los datos también se ajustaron para modelos de respuesta sigmoïdal, como se muestra en las Figuras 10-13.

Tabla 8: Ensayo de ADCC en Varias líneas Celulares						
Línea Celular	Anticuerpos	CE50 (ng/ml)	p	Lisis máxima (%)	p	Figura (Panel)
MDA-MB-435	ch4D5-FcMT1	ND	-	5	NS	10 (A)
	ch4D5-FcMT2	ND	-	13	NS	
	ch4D5-FcMT3	ND	-	7	NS	
	ch4D5-FcWT	ND	-	7	-	
	trastuzumab	ND	-	7	NS	
MDA-MB-231	ch4D5-FcMT1	4	NS	27	NS	10 (B)
	ch4D5-FcMT2	12	NS	29	NS	
	ch4D5-FcMT3	?	?	24	NS	
	ch4D5-FcWT	9	-	27	-	
	trastuzumab	7	NS	22	NS	
A549	ch4D5-FcMT1	14	-	34	<0,01	11 (A)
	ch4D5-FcMT2	21	-	24	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	> 100	-	23	<0,01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	6	-	
	trastuzumab	ND	-	5	NS	
OVCAR-8	ch4D5-FcMT1	14	<0,01	43	<0,01	11 (B)
	ch4D5-FcMT2	21	<0,05	40	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	26	NS	36	<0,01	
	ch4D5-FcWT	57	-	16	-	
	trastuzumab	37	NS	13	NS	
MCF-7	ch4D5-FcMT1	4	<0,05	55	<0,01	11 (C)
	ch4D5-FcMT2	9	NS	51	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	8	NS	48	<0,01	
	ch4D5-FcWT	23	NS	32	-	
	trastuzumab	9	-	21	NS	

Tabla 8: Ensayo de ADCC en Varias líneas Celulares						
Línea Celular	Anticuerpos	CE50 (ng/ml)	p	Lisis máxima (%)	p	Figura (Panel)
BT-20	ch4D5-FcMT1	42	<0,01	66	<0,01	11 (D)
	ch4D5-FcMT2	78	<0,01	62	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	67	<0,01	55	<0,01	
	ch4D5-FcWT	>100	-	33	-	
	trastuzumab	>100	NS	25	NS	
HT-29	ch4D5-FcMT1	0,4	-	43	<0,01	11 (E)
	ch4D5-FcMT2	0,5	-	44	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	1	-	38	<0,01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	13	-	
ZR75-1	ch4D5-FcMT1	14	<0,01	78	<0,01	12 (A)
	ch4D5-FcMT2	20	NS	67	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	26	<0,01	63	<0,01	
	ch4D5-FcWT	38	-	38	-	
	trastuzumab	ND	-	23	<0,01	
JIMT-1	ch4D5-FcMT1	8	NS	73	<0,01	12 (B)
	ch4D5-FcMT2	7	<0,05	70	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	10	NS	65	<0,01	
	ch4D5-FcWT	22	-	43	-	
	trastuzumab	10	NS	34	NS	
MDA-MB-453	ch4D5-FcMT1	3	<0,05	59	<0,01	13 (A)
	ch4D5-FcMT2	4	<0,05	58	<0,01	
	ch4D5-FcMT3	6	NS	57	<0,01	
	ch4D5-FcWT	11	-	45	-	
	trastuzumab	3	<0,05	31	<0,01	
BT-474	ch4D5-FcMT1	3	<0,01	73	<0,01	13 (B)
	ch4D5-FcMT2	3	<0,05	58	NS	
	ch4D5-FcMT3	4	<0,05	71	NS	
	ch4D5-FcWT	11	-	64	-	
	trastuzumab	7	NS	60	NS	

Tabla 8: Ensayo de ADCC en Varias líneas Celulares						
Línea Celular	Anticuerpos	CE50 (ng/ml)	p	Lisis máxima (%)	p	Figura (Panel)
SKBR-3	ch4D5-FcMT1	0,4	<0,01	64	NS	13 (C)
	ch4D5-FcMT3	0,8	<0,01	61	NS	
	ch4D5-FcWT	6	-	62	-	
mSKOV-3	ch4D5-FcMT1	1,2	NS	71	<0,01	13 (D)
	ch4D5-FcMT2	7	<0,05	43	<0,05	
	ch4D5-FcMT3	0,9	<0,05	56	NS	
	ch4D5-FcWT	3	-	58	-	

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente con HER2/neu que comprende:
 - (A) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de una cadena ligera de inmunoglobulina de 4D5 quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y
 - 5 (B) un segundo polipéptido que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina de 4D5 variante que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicho segundo polipéptido comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicho segundo polipéptido comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.
- 15 5. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicho segundo polipéptido comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha cadena pesada comprende un dominio de Fc variante que muestra, en comparación con un dominio de Fc natural:
 - (A) citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) mejorada;
 - (B) unión aumentada con FcγRIIA o FcγRIIIA;
 - 20 (C) unión disminuida con FcγRIIB; o
 - (D) unión aumentada con FcγRIIB.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer que expresa HER2/neu en un paciente.
- 25 9. El uso de la reivindicación 8, en donde dicho medicamento además comprende la etapa de administrar un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente anti-angiogénico, un agente anti-neoplásico, un agente quimioterapéutico y un agente citotóxico.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de cáncer que expresa HER2/neu en un paciente
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

	10	20	30
Murino	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVN		
Quimérico	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVN		
Humanizado	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDVN		
	40	50	60
Murino	TAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRTYTGVPD		
Quimérico	TAVAWYQQKPGHSPKLLIYSASFRTYTGVPD		
Humanizado	TAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLESGVPS		
	70	80	90
Murino	RFTG N RS GTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ		
Quimérico	RFTG S RS GTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ		
Humanizado	RFSG S RS GTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQ		
	100	109	
Murino	HYTTPPTFGGGTKLEIKRA		
Quimérico	HYTTPPTFGGGTKVEIKRT		
Humanizado	HYTTPPTFGQG TKVEIKRT		

Figura 1

MT1 QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY 60
MT2 QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY 60
MT3 QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY 60
WT QVQLQQSGPELVKPGASLKLSTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY 60

MT1 DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSED~~TA~~VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS 120
MT2 DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSED~~TA~~VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS 120
MT3 DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSED~~TA~~VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS 120
WT DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRLTSED~~TA~~VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS 120

MT1 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
MT2 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
MT3 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
WT ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180

MT1 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG 240
MT2 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGG 240
MT3 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG 240
WT GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG 240

MT1 PSVFL~~LP~~PKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP~~PEE~~QYN 300
MT2 PSVFL~~LP~~PKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP~~PEE~~QYN 300
MT3 PSVFL~~LP~~PKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP~~PEE~~QYN 300
WT PSVFL~~F~~PKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP~~REE~~QYN 300

MT1 ST~~LR~~VVS~~IL~~TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE 360
MT2 ST~~LR~~VVS~~VL~~TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE 360
MT3 ST~~LR~~VVS~~VL~~TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE 360
WT STYRVVS~~VL~~TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE 360

MT1 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420
MT2 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420
MT3 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420
WT LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 420

MT1 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 450
MT2 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 450
MT3 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 450
WT QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 450

Figura 2

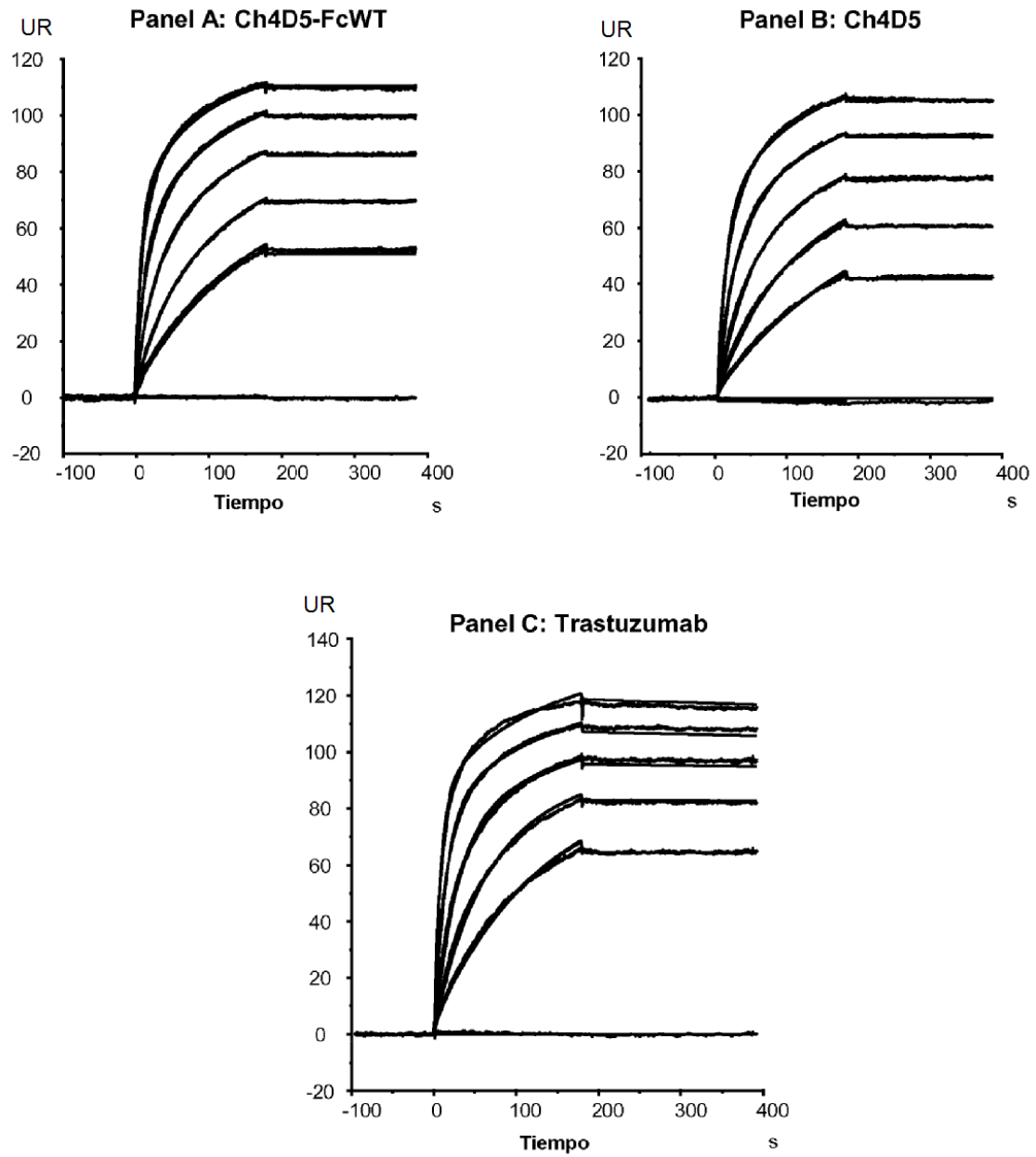


Figura 3

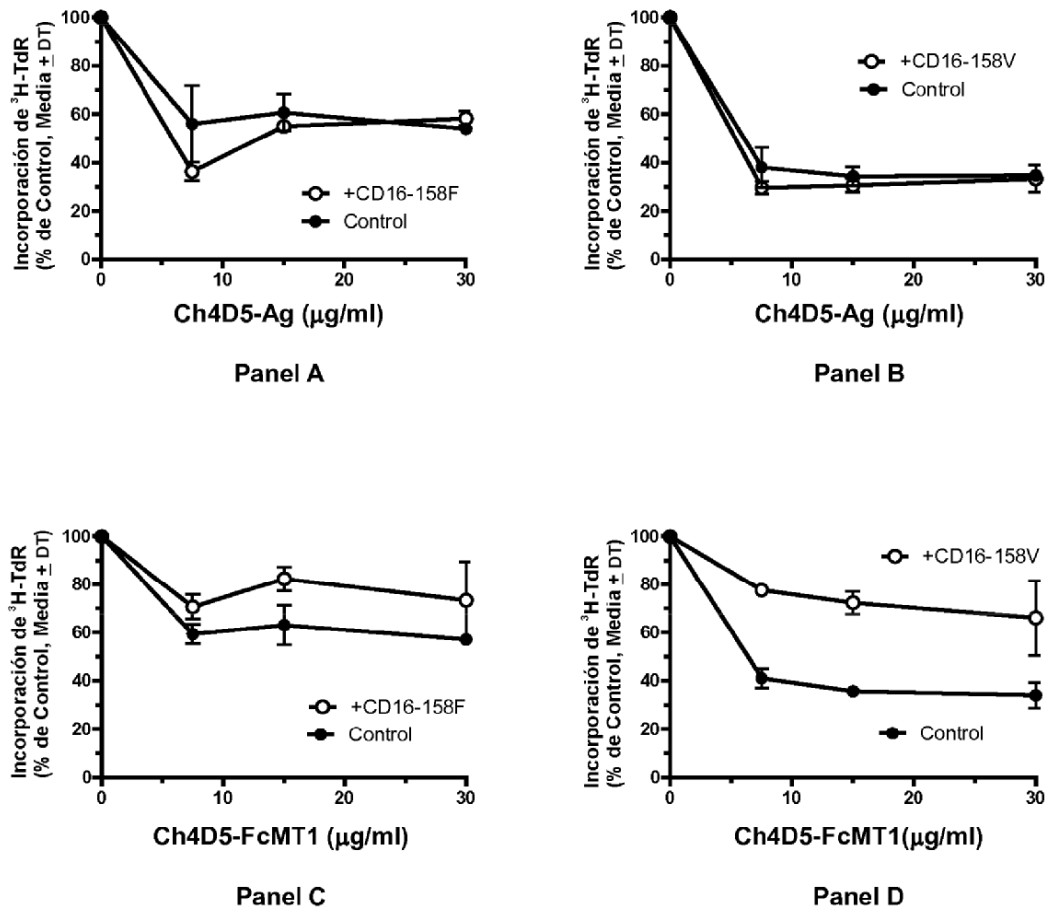


Figura 4

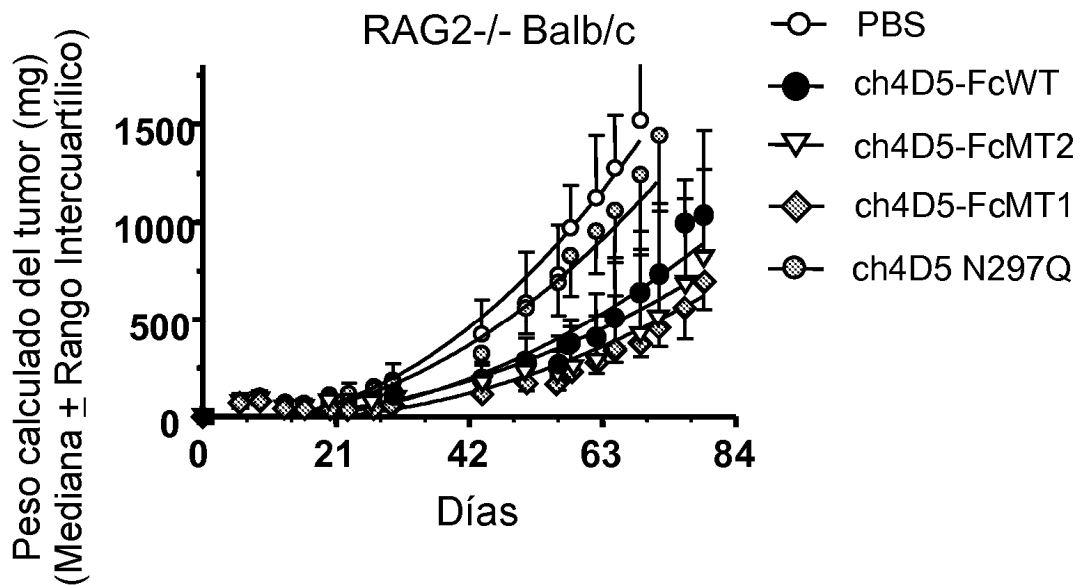


Figura 5

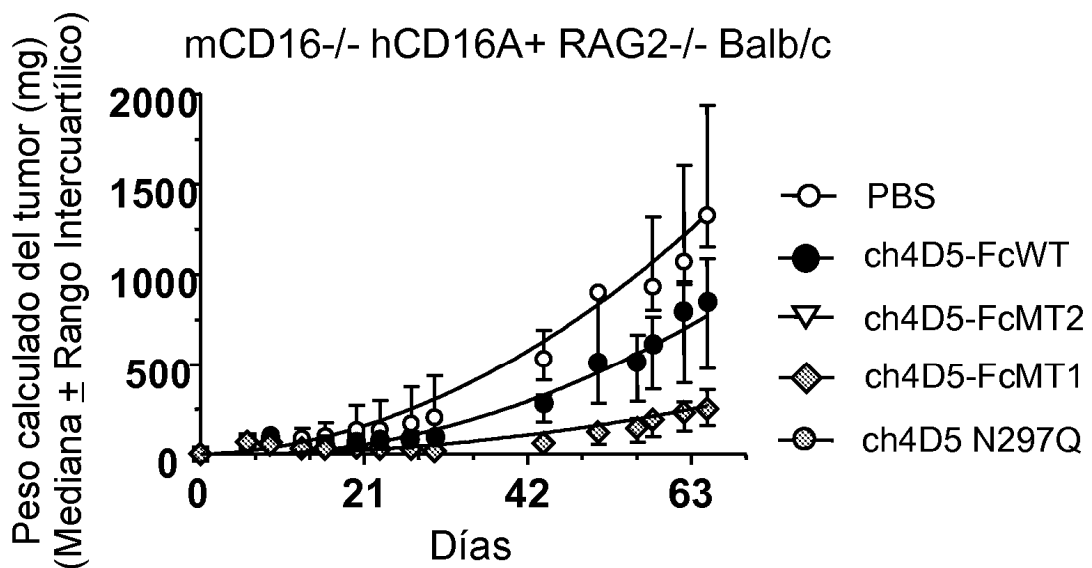


Figura 6

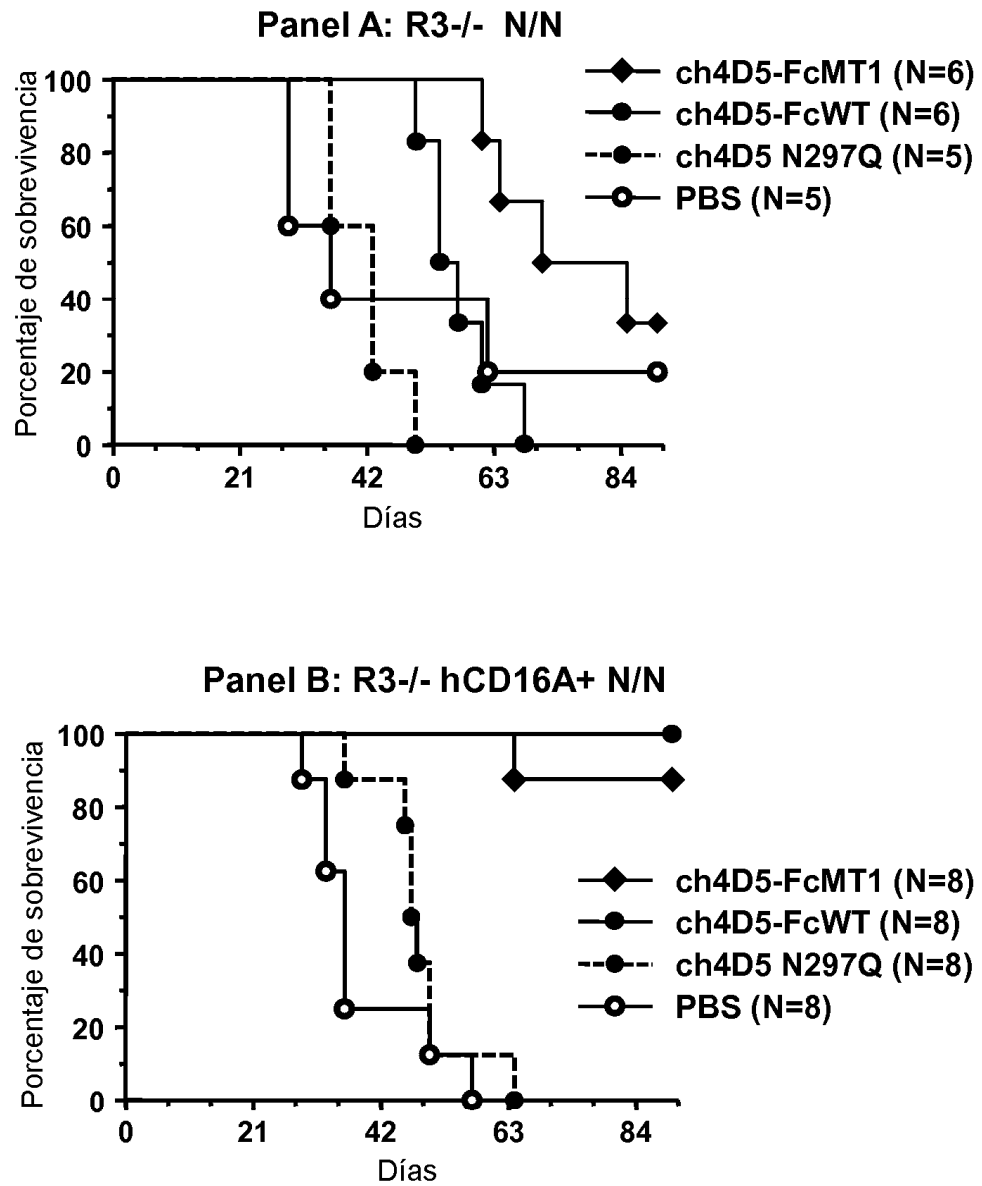


Figura 7

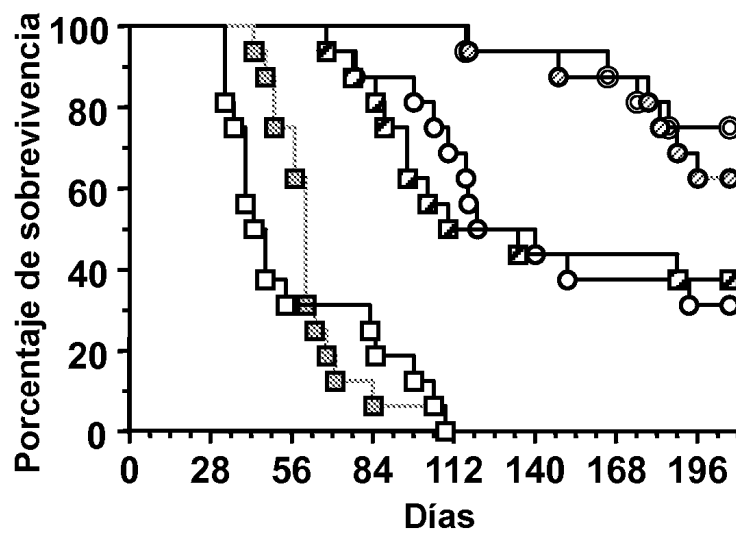


Figura 8

○ ch4D5-FcMT3 ■ ch4D5
 ● ch4D5-FcMT1 ■ ch4D5Ag
 ○ ch4D5-FcMT4 □ PBS

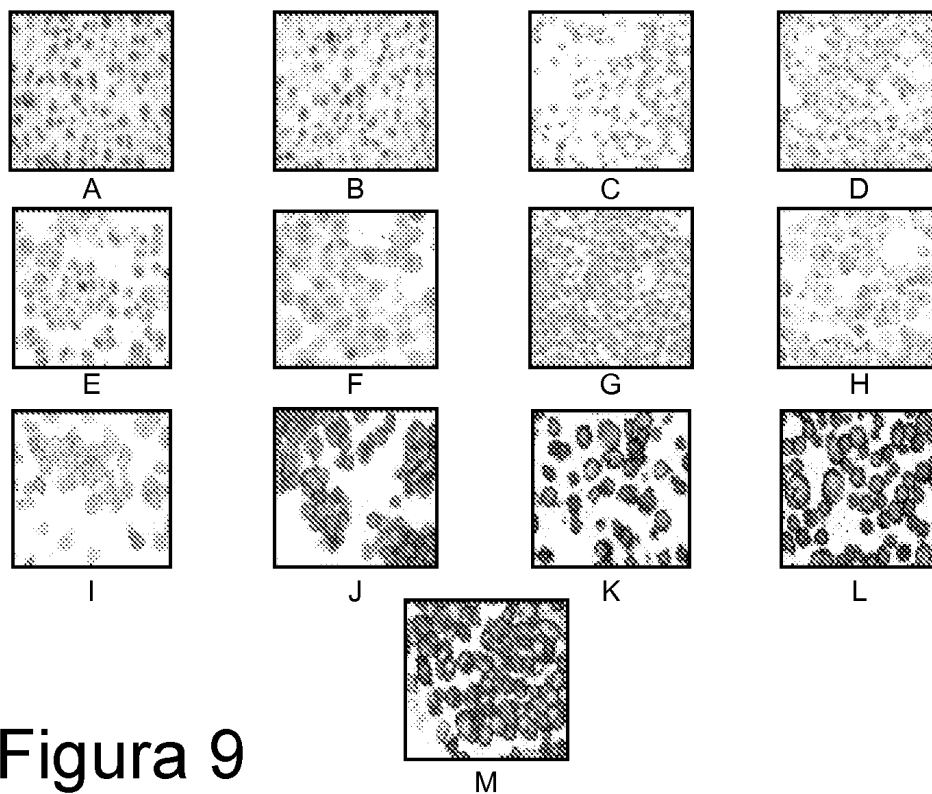
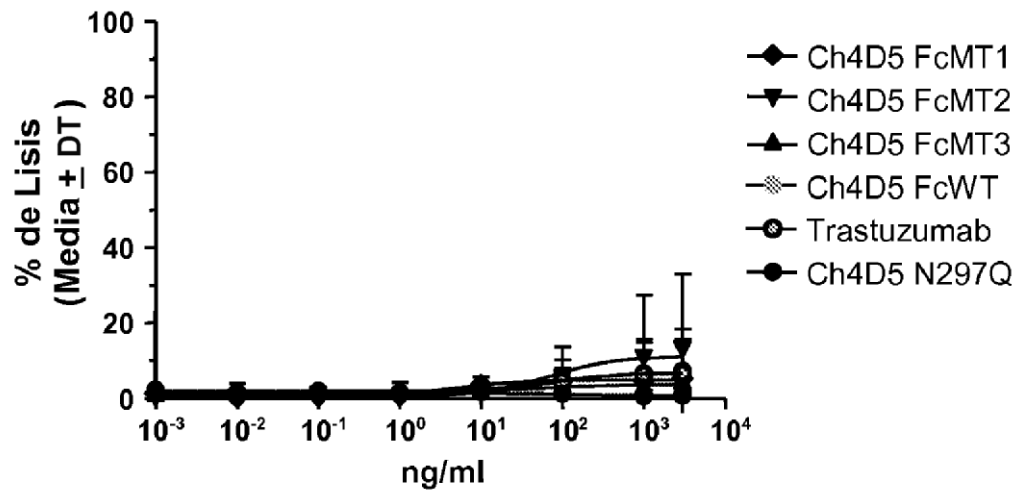


Figura 9

Panel A: MDA-MB-435 (N=3)



Panel B: MDA-MB-231 (N=3)

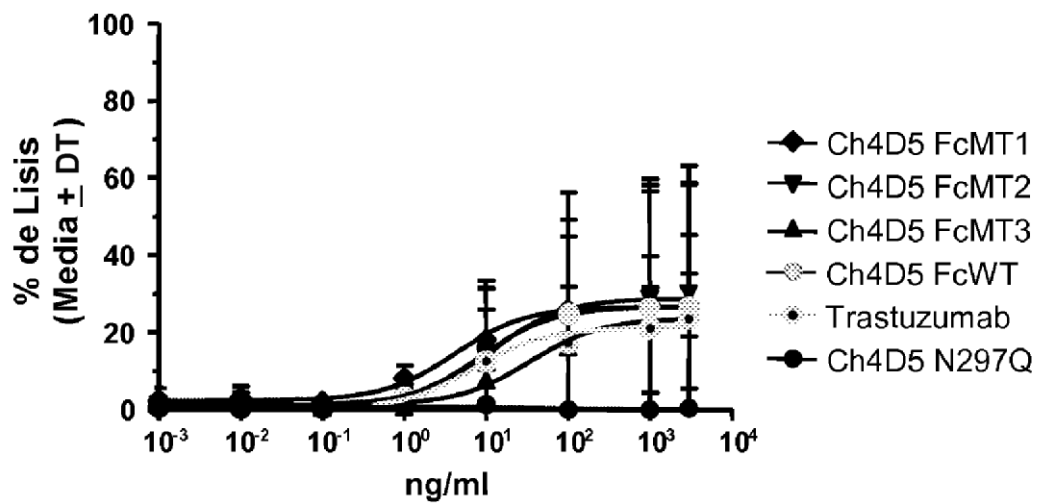


Figura 10

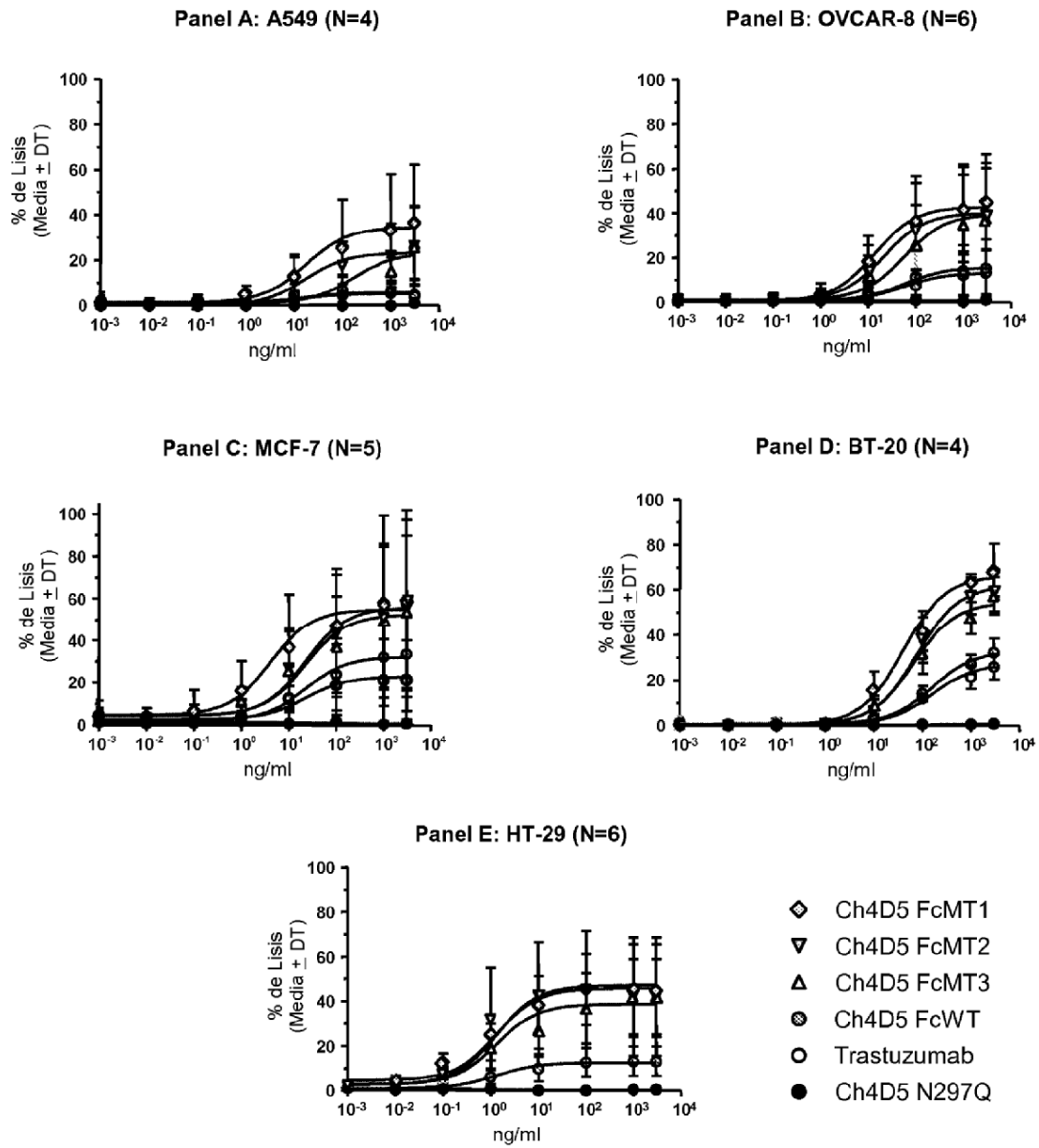


Figura 11

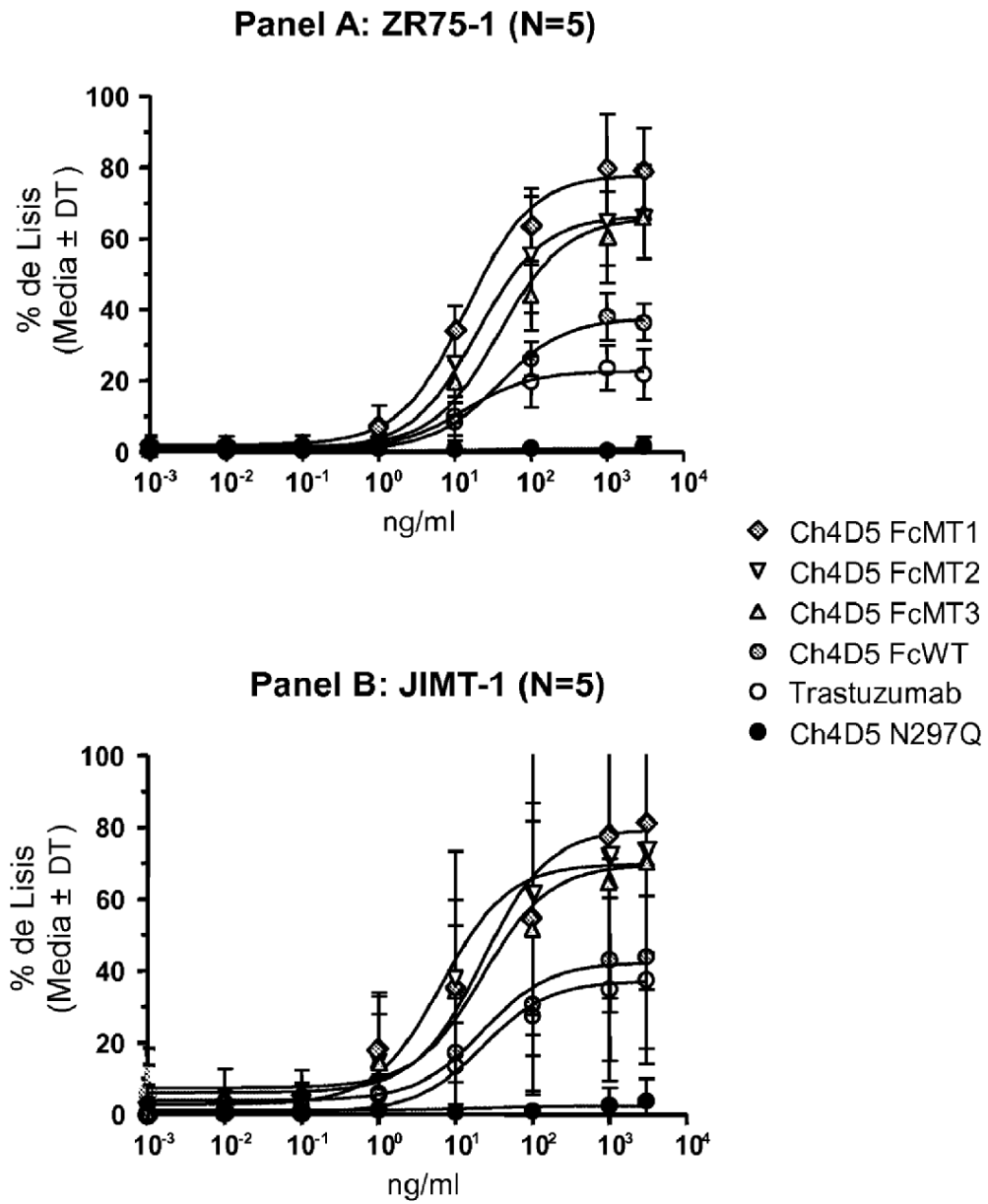


Figura 12

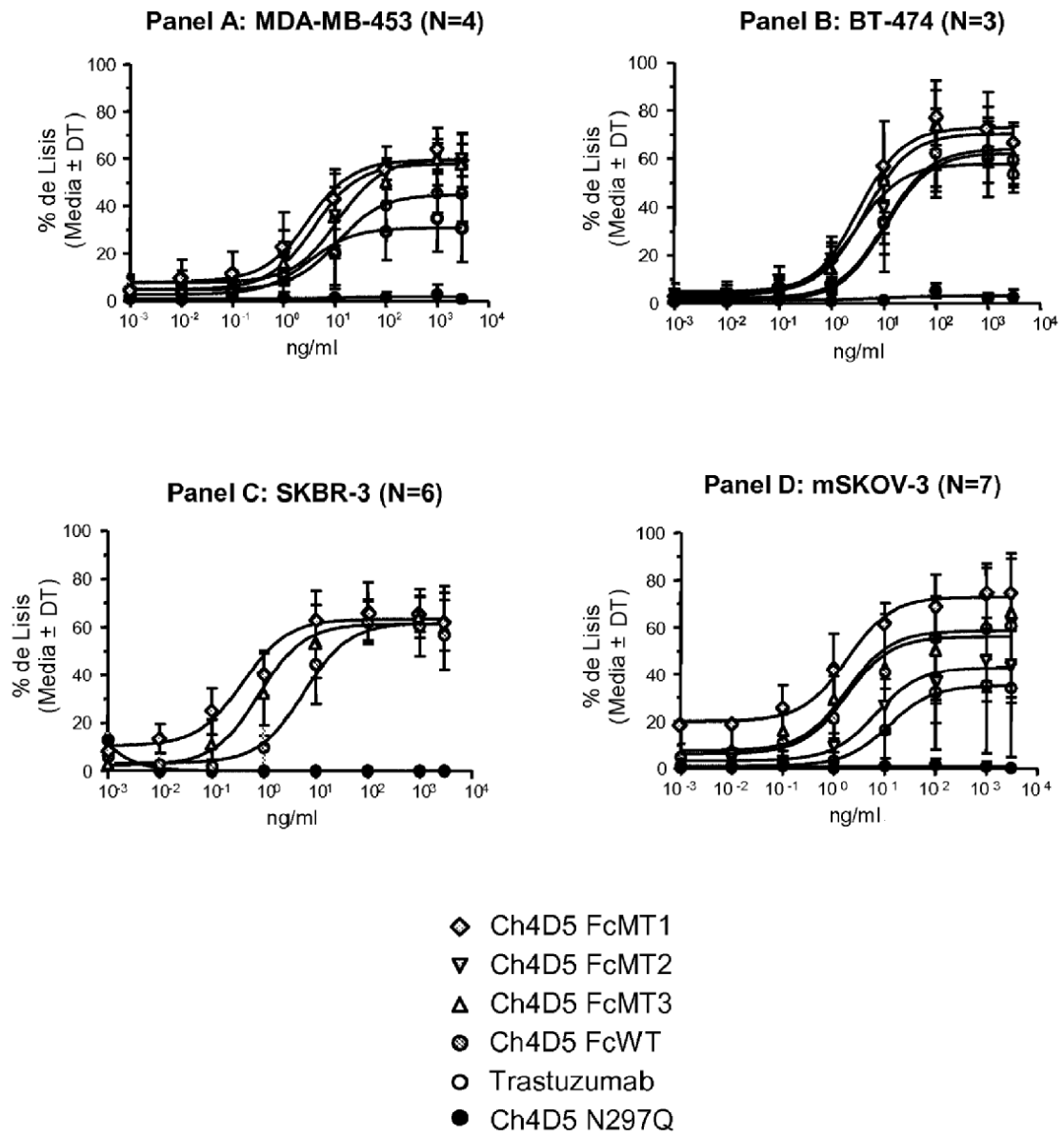


Figura 13