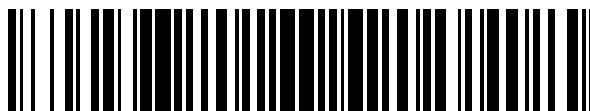


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 912**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12P 21/08 (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/US2009/038171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09151717**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009 E 09763010 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2252631**

54 Título: **Anticuerpos específicos para el complejo BCR y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

02.04.2008 US 41659 P

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

17.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOHNSON, LESLIE S. y
HUANG, LING**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 589 912 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 el complejo BCR y procedimientos de uso de los mismos

Antecedentes de la invención:**Campo de la invención:**

5 La presente invención se refiere a los anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen específicamente al complejo BCR y particularmente a los anticuerpos quiméricos y humanizados para el complejo BCR. La invención también se refiere a los procedimientos de uso de los anticuerpos y a las composiciones que los comprenden en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas.

10 Descripción de la técnica relacionada:**El receptor de linfocitos B (BCR) y el complejo BCR**

Los linfocitos B son células del sistema inmunitario que son responsables de la producción de anticuerpos. La respuesta de los linfocitos B frente a un antígeno es un componente esencial del sistema inmunitario normal. Los linfocitos B poseen receptores de superficie celular especializados (receptores de linfocitos B; "BCR"). Si un linfocito B se encuentra con un antígeno que se pueda unir al BCR de esa célula, se estimula el linfocito B para proliferar y producir anticuerpos específicos para el antígeno unido. Para generar una respuesta eficaz frente a los antígenos, también se requiere la asistencia de linfocitos T y proteínas asociadas a BCR. El complejo BCR/antígeno se internaliza y el antígeno se procesa proteolíticamente. Una pequeña parte del antígeno permanece en forma de complejo con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II ("MHCII") en la superficie de los linfocitos B donde el complejo se puede reconocer por los linfocitos T. Los linfocitos T activados mediante dicha presentación de antígeno secretan una variedad de linfocinas que inducen la maduración de linfocitos B.

La señalización a través del BCR desempeña un importante papel en la generación de anticuerpos, en la autoinmunidad y en el establecimiento de la tolerancia inmunológica (Gauld *et al.* (2002) *Science* 296(5573): 1641-1642). Los linfocitos B inmaduros que se unen a autoantígenos mientras que todavía están en la médula ósea se eliminan mediante apoptosis. Por el contrario, la unión a antígeno en los linfocitos B maduros da como resultado la activación, proliferación, anergia y apoptosis. La respuesta funcional particular observada depende de si el linfocito B recibe señales coestimulantes a través de otros receptores de superficie y de las rutas de transducción de señales específicas que se activan.

El BCR está compuesto de una inmunoglobulina de membrana que, junto con las subunidades α y β asociadas no covalentemente de CD79 ("CD79a" y "CD79b", respectivamente), forma el complejo BCR. Las CD79a y CD79b son subunidades de transducción de señales que contienen un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina ("ITAM") conservado requerido para la transducción de señales (Dylke *et al.* (2007) *Immunol. Lett.* 112(I):47-57; Cambier (1995) *Immunol. Today* 16:110). La agregación del complejo BCR por el antígeno multivalente inicia la transfosforilación de los ITAM de las CD79a y CD79b y la activación de las cinasas asociadas al receptor (DeFranco (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:296-308; Kurosaki (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:309-318; Kim *et al.* (1993) *Immun. Rev.* 132:125-146). Los ITAM fosforilados incorporan efectores adicionales, tales como PI_3K , PLC- γ y miembros de la ruta Ras/MAPK. Estos acontecimientos de señalización son responsables tanto de la proliferación de linfocitos B como de la expresión incrementada de marcadores de activación (tales como MHCII y CD86) que se requieren para sensibilizar a los linfocitos B para sus interacciones posteriores con linfocitos T cooperadores ("T_h").

La expresión de CD79 está restringida a los linfocitos B y se expresa en células de linfoma no hodgkiniano (LNH) (Olejniczak *et al.* (2006) *Immunol. Invest.* 35:93-114; D'Arena *et al.* (2000) *Am. J. Hematol.* 64:275-281; Cabezudo *et al.* (1999) *Haematologica* 84:413-18). Las CD79a y CD79b y las inmunoglobulinas solubles ("sIg") se requieren en su totalidad para la expresión en la superficie de la CD79. La expresión en la superficie promedio de CD79b en los LNH es similar a la observada en los linfocitos B normales, pero con un intervalo mayor (Matsuuchi *et al.* (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13(3):270-277). La expresión de CD79b en células de leucemia linfocítica crónica se correlaciona con mutaciones en el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina, pero no parece servir como una variable independiente de la gravedad clínica (Cajiao *et al.* (2007) *Am J. Hematol.* 82(8):712-720). Tanto CD79a como CD79b están implicadas en la señalización independiente de antígeno (tónica) y dependiente de antígeno por el BCR (Fuentes-Panana *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177(11):7913-7922).

Los anticuerpos que se unen al complejo BCR ("anticuerpos anti-complejo BCR") han demostrado que perturban la señalización por BCR, provocando la disociación del BCR o bien suprimiendo (regulando por disminución) la función del BCR (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.503.509; Poison *et al.* (2007) *Blood* 110(2):616-623; Zhang *et al.* (1995) *Ther. Immunol.* 2(4):191-202). La supresión es generalmente más deseable, porque evita el agotamiento de linfocitos B potencialmente indeseable y los efectos secundarios resultantes. Dichos anticuerpos anti-complejo BCR tienen uso terapéutico en el tratamiento de la autoinmunidad, cáncer, enfermedad inflamatoria y trasplante. No obstante, puesto que los sistemas inmunitarios humanos atacan a anticuerpos murinos anti-complejo BCR, se desean anticuerpos mejorados cuyo uso suscite una respuesta reducida de anticuerpos humanos

antimurinos ("HAMA"). Asimismo, se desean anticuerpos anti-complejo BCR que muestren afinidad de unión mejorada o función efectora alterada.

Receptores Fc

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

15 Los receptores Fc, miembros de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas de proteínas, son glucoproteínas de superficie que se pueden unir la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento en la cadena α del receptor Fc. Los receptores Fc se definen por su especificidad frente a los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se denominan "Fc γ R", para IgE "F ϵ R" y para IgA "Fc α R". Diferentes células accesorias llevan receptores Fc para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias intervienen en una respuesta dada (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* (4.º ed. 1999), Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York). En la tabla 1 se presenta una visión general de los diversos receptores.

TABLA 1
Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulinas

Receptor	Unión	Tipo de células	Efecto de fijación
Fc γ RI (CD64)	IgG1 $10^8 M^{-1}$	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Captación Estimulación Activación de explosión respiratoria Inducción de muerte
Fc γ RII-A (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhans	Captación Liberación de gránulos
Fc γ RII-B1 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	Linfocitos B Mastocitos	Sin captación Inhibición de estimulación
Fc γ RII-B2 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación Inhibición de estimulación
Fc γ RIII (CD16)	IgG1 $5 \times 10^5 M^{-1}$	Linfocitos NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Inducción de muerte
F ϵ RI	IgE $10^{10} M^{-1}$	Mastocitos Eosinófilo Basófilos	Secreción de gránulos
Fc α RI (CD89)	IgA1, IgA2 $10^7 M^{-1}$	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Captación Inducción de muerte

Cada receptor Fcγ ("FcγR") es una glucoproteína integral de membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un único dominio que abarca la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Hay cuatro FcγR conocidos, designados FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIV. Los receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la extensa homología entre los miembros de la familia sugiere que surgieron a partir de un progenitor común, tal vez mediante duplicación génica.

Tanto las señales de activación como inhibitoras se transducen a través de los FcγR tras la fijación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos en los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamados motivos de activación de inmunoreceptores basados en tirosina (ITAM) o motivos de inhibición de inmunoreceptores basados en tirosina (ITIM) explican las diferentes respuestas. La incorporación de diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras dicta 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 únicamente incluyen FcγRIIB.

El FcγRI presenta alta afinidad por la región constante del anticuerpo y especificidad de isotipo restringida (Hulett and Hogarth (1994) *Adv Immunol* 57:1-127). Las proteínas FcγRII son glucoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que se unen únicamente a la IgG en forma de complejo debido a una baja afinidad por Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el FcγR expresado más ampliamente, presente en todas las células hemopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. FcγRII tiene únicamente dos regiones similares a inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y de ahí una afinidad mucho más baja por IgG que FcγRI. Hay tres genes FcγRII humanos conocidos (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales se unen a IgG en agregados o inmunocomplejos. Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. El gen FcγRIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es un 96 % idéntico a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible.

Las distintas diferencias en los dominios citoplásmicos de FcγRII-A y FcγRII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la fijación del receptor. La isoforma FcγRII-A inicia la señalización intracelular que da lugar a la activación celular, tal como fagocitosis y explosión respiratoria, mientras que la isoforma FcγRII-B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, inhibiendo la activación de linfocitos B. El agrupamiento de FcγRIIA por medio de inmunocomplejos o entrecruzamientos de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con cinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la cinasa Syk, la activación de la cual da como resultado la activación de sustratos subsiguientes (por ejemplo, PI_3K). La activación celular da lugar a la liberación de mediadores proinflamatorios. Cuando se fijan simultáneamente o agregan simultáneamente junto con un FcγR de activación que tiene un ITAM, tal como FcγRIIA o FcεRI, el ITIM en FcγRIIB se fosforila e incorpora el dominio SH2 de la inositol fosfatasa que contiene homología scr de tipo 2 (SHIP), que, a su vez, se fosforila y asocia con Shc (Ott (2002) *J. Immunol.* 162(9):4430-4439; Yamashi *et al.* (1997) *Cell* 88:205; Carpino *et al.* (1997) *Cell* 88:197). La SHIP hidroliza mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FcγR que contienen ITAM, por consiguiente, impidiendo la entrada de Ca^{++} intracelular y amortiguando el grado de respuesta celular a la fijación de FcγR. De esta manera, se interrumpe la activación de los linfocitos B, la proliferación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos y se regula por disminución la fagocitosis mediada por FcγR (Tridandapani *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277(7):5082-89).

Específicamente, la agregación simultánea de FcγRIIA con FcγRIIB da como resultado la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina cinasa que está implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis, y la agregación simultánea de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad FcεRI en los mastocitos da lugar a la inhibición de la desgranulación inducida por antígeno, la movilización del calcio, y la producción de citocinas (Long (1999) *Annu Rev. Immunol* 17:875; Metcalfe *et al.* (1997) *Physiol. Rev.* 77:1033). La agregación simultánea de FcγRIIB y el receptor de linfocitos B (BCR) da lugar a la inhibición de la señalización mediada por BCR, y la inhibición de la evolución del ciclo celular y la supervivencia celular. Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización por BCR están mediadas a través de SHIP, se ha demostrado recientemente que los linfocitos B activados por lipopolisacáridos (LPS) de ratones deficientes en SHIP muestran inhibición mediada por FcγRIIB significativa de la movilización del calcio, producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al.* (2001) *Journal of Immunology* 167(1): 204-211).

El tamaño de FcγRIII varía entre 40 y 80 kDa en el ratón y en el hombre, debido a la heterogeneidad en esta clase. Dos genes humanos codifican dos transcritos, FcγRIIIA, una glucoproteína integral de membrana, y FcγRIIIB, una versión ligada a glucosilfosfatidilinositol (GPI). Un gen murino codifica un homólogo de FcγRIII con respecto al FcγRIIIA humano que abarca la membrana. El FcγRIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos FcγR. Como FcγRII, FcγRIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios extracelulares similares a Ig correspondientes. FcγRIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos, y es el único FcγR en los linfocitos NK. Actualmente se sabe que el FcγRIIIB ligado a GPI se expresa únicamente en los neutrófilos humanos.

FcγRIV (también conocido como mFcRIV) requiere la asociación de la cadena gamma de FcR para la expresión y función óptimas en las células mieloides; su potencial de señalización también se potencia por un motivo

citoplásmico "YEEP" que incorpora la molécula adaptadora Crk-L y fosfatidilinositol-3-OH cinasa. FcγRIV se une preferentemente a anticuerpos de inmunoglobulina E del alotipo b (IgEb), así como a anticuerpos IgG2a e IgG2b. La fijación de FcγRIV mediante inmunocomplejos antígeno-IgEb promueve la fagocitosis mediada por macrófagos, la presentación de antígeno a linfocitos T, la producción de citocinas proinflamatorias y la fase tardía de reacciones alérgicas cutáneas (Hirano *et al.* (2007) *Nature Immunology* 8:762-771). FcγRIV es un receptor identificado recientemente, conservado en todas las especies de mamíferos con afinidad intermedia y especificidad de subclase restringida (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). FcγRIII y FcγRIV son FcγR de activación fisiológicamente importantes para mediar la enfermedad inflamatoria desencadenada por anticuerpos citotóxicos o inmunocomplejos patógenos. FcγRI se encuentra en las células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos.

A pesar de dichos avances en su totalidad, persiste la necesidad de obtener anticuerpos anti-complejo BCR que posean un uso terapéutico en el tratamiento de la autoinmunidad, cáncer, enfermedad inflamatoria y/o trasplante, y que muestren una capacidad mejorada para mediar la función efectora de los receptores Fc. La presente invención está dirigida a esta y otras necesidades. Poison G. *et al.* (2007) *Blood* 110(2):616-623 afirma divulgar el uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) para dirigir fármacos citotóxicos a células cancerosas y, en particular, ADC anti-CD79b para el tratamiento de linfomas no hodgkinianos.

Sumario de la invención:

La invención proporciona un polipéptido que se une al complejo receptor de linfocitos B (BCR) humano, en el que dicho polipéptido comprende: (I) la secuencia aminoacídica de una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que es una variante humanizada de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo para el complejo BCR natural (BCC V_L), en la que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20; y (II) la secuencia aminoacídica de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que es una variante humanizada de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo para el complejo BCR natural (BCC V_H), en la que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 36.

Los polipéptidos pueden ser anticuerpos que se unen específicamente al complejo BCR humano. Los polipéptidos pueden comprender un dominio Fc de variante, que comprende una o más modificaciones, confiriendo las modificaciones una alteración del fenotipo en el polipéptido, incluyendo función efectora alterada, unión incrementada o disminuida a un FcγR, etc. La invención proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos y anticuerpos. También se describen vectores que comprenden los polinucleótidos, y células huésped que comprenden los vectores. Se describen procedimientos de producción de los polipéptidos y anticuerpos. La invención proporciona los polipéptidos para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

La invención proporciona adicionalmente los modos de realización de dichos polipéptidos en su totalidad, en la que el polipéptido es un anticuerpo monocatenario o un diacuerpo.

La invención también proporciona los modos de realización de dichos polipéptidos, en la que el polipéptido es un anticuerpo, y particularmente en la que dicho anticuerpo comprende un dominio Fc de variante que comprende al menos una modificación en el dominio Fc con respecto a un dominio Fc natural.

La invención también proporciona los modos de realización de dichos polipéptidos, en la que la modificación comprende:

- (A) al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F243L, D270E, R292P, S298N, Y300L, V305I, A330V y P396L;
- (B) al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L y P396L; F243L y R292P; y R292P y V305I;
- (C) al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P y Y300L; F243L, R292P y V305I; F243L, R292P y P396L; y R292P, V305I y P396L;
- (D) al menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P, Y300L y P396L; y F243L, R292P, V305I y P396L; o
- (E) al menos las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L

La invención también proporciona los modos de realización de dichos polipéptidos, en la que el dominio Fc de variante muestra una función efectora alterada en comparación con un dominio Fc natural, en la que la función efectora alterada está seleccionada del grupo que consiste en:

- (A) función de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) potenciada;

- (B) función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) potenciada;
- (C) unión incrementada a un FcγR de activación en comparación con un dominio Fc natural;
- (D) unión disminuida a FcγRIIB en comparación con un dominio Fc natural; o
- (E) unión incrementada a FcγRIIB en comparación con un dominio Fc natural.

5 La invención también proporciona los modos de realización de dichos polipéptidos, en la que el polipéptido es un fragmento F(ab')₂, un anticuerpo monoclonal, un fragmento F(ab), un anticuerpo monocatenario o un diacuerpo, y/o en la que el anticuerpo está ligado de manera funcional a un polipéptido heterógeno.

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los polipéptidos anteriores.

10 La invención también incluye cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer (especialmente un cáncer hematopoyético, tal como linfoma (por ejemplo, linfoma no hodgkiniano), una leucemia o un mieloma) o en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria mediada por mecanismos inmunitarios o autoinmunitarios (especialmente, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, soriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, diabetes de tipo 1, vasculitis, asma, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped y enfermedad intestinal inflamatoria).

15 La invención también incluye cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para el uso en el tratamiento del cáncer, en la que el tratamiento comprende la etapa de administrar un segundo agente terapéutico simultánea o secuencialmente con el anticuerpo.

Preferentemente, el segundo agente terapéutico está seleccionado de un agente antiangiogénico, un agente antineoplásico, un agente quimioterápico y un agente citotóxico.

20 La invención se dirige adicionalmente a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria mediada por mecanismos inmunitarios o autoinmunitarios (especialmente, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, soriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, diabetes de tipo 1, vasculitis, asma, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped y enfermedad intestinal inflamatoria).

25 **Breve descripción de los dibujos:**

La figura 1 representa una alineación que compara las regiones variables de la cadena ligera de un anticuerpo BCC1 quimérico (SEQ ID NO: 37) y un anticuerpo BCC2 humanizado (SEQ ID NO: 10) de la divulgación con respecto al anticuerpo BCC2 natural (SEQ ID NO: 6). Los residuos destacados en gris indican residuos que difieren del consenso; Kabat 37 y 45 se muestran en negrita y subrayados (numeración por debajo de la secuencia).

30 La figura 2 es un gráfico que representa diversos residuos modificados en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo BCC2 humanizado de la divulgación.

La figura 3 representa una alineación que compara las regiones variables de la cadena pesada de un anticuerpo BCC1 quimérico (SEQ ID NO: 38) y un anticuerpo BCC2 humanizado (SEQ ID NO: 22) de la divulgación con respecto al anticuerpo BCC2 natural (SEQ ID NO: 8). Los residuos destacados en gris indican residuos que difieren del consenso; los residuos Kabat 48, 62, 66, 67, 69, 71 y 73 se muestran en negrita y subrayados (numeración por debajo de la secuencia).

35

La figura 4 representa los resultados de un ELISA de unión realizado para someter a ensayo la unión de anticuerpos que tienen diversas cadenas ligeras, incluyendo los anticuerpos chBCC2, hBCC, hLc-2/chHc, hLc-3/chHc, hLc-4/chHc y hLc-1/chHc

40 La figura 5 representa los resultados de un ELISA de unión realizado para someter a ensayo la unión de anticuerpos que tienen diversas cadenas pesadas, incluyendo los anticuerpos chLc/hHc-1, chLc/hHc-2, chLc/hHc-3, chLc/hHc-4, chLc/hHc-5, chLc/hHc-6, chBCC2 y hBCC

La figura 6 representa el resultado de un ELISA de unión realizado para someter a ensayo la unión de anticuerpos que tienen varias cadenas ligeras y pesadas, incluyendo hLc-4/hHc-2, hLc-4/hHc-7, hLc-4/hHc-8, hLc6/hHc-2, hLc-6/hHc-7, hLc-6/hHc-8, chBCC1 y chBCC2.

45

Descripción detallada de la invención:

La presente invención proporciona anticuerpos quiméricos y humanizados frente al complejo BCR. Los anticuerpos y las composiciones que los comprenden se pueden usar en el diagnóstico y el pronóstico. Los anticuerpos y composiciones que los comprenden se proporcionan para su uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades, tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas.

50

Ahora se hace referencia en detalle a los modos de realización actualmente preferentes de la invención, que, junto con los dibujos y los ejemplos siguientes, sirven para explicar los principios de la invención. Estos modos de realización se describen con suficiente detalle para posibilitar que los expertos en la técnica pongan en práctica la invención. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Un experto en la técnica puede consultar textos de referencia generales para obtener dichas definiciones o para obtener descripciones detalladas de las técnicas analizadas en el presente documento. Estos textos incluyen, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, y los suplementos en marzo de 2008), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook and Russell, 3.º ed., 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 los suplementos en marzo 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 los suplementos en marzo 2008), *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman & Gilman, 11.º ed., 2006), y *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Lippincott Williams & Wilkins, 21.º edición (2005).

A. Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "ADCC" se refiere a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, una reacción mediada por células *in vitro* en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR (por ejemplo, células monocíticas, tales como linfocitos citolíticos naturales (NK) y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a un epítipo, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos que contienen dominio VL o bien VH o una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une inmunoespecíficamente a un antígeno, etc.), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales, Fv biespecíficos enlazados por disulfuro (sdFv), intracuerpos, y diacuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, el término anticuerpos pretende englobar moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase (véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs: 20040185045; 20050037000; 20050064514; 20050215767; 20070004909; 20070036799; 20070077246; y 20070244303).

La referencia a un "receptor antigénico de linfocitos B" o "BCR" pretende hacer referencia al receptor antigénico de linfocitos B, que incluye un componente de unión a antígeno de inmunoglobulina de membrana (mlg), o una porción biológicamente activa del mismo (es decir, una porción que se puede unir a un ligando y/o que se puede asociar con un componente transductor). El término "complejo BCR" pretende hacer referencia al complejo de BCR con el transductor CD79a y componentes CD79b, o porciones biológicamente activas del mismo (es decir, una porción que puede transducir una señal intracelular y/o que se puede asociar con una porción extracelular de unión a ligando).

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor que resulta de un crecimiento incontrolado anómalo de células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunos modos de realización, el cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otros modos de realización, el cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales cercanas y se extiende a sitios distantes. En algunos modos de realización, el cáncer se asocia con un antígeno del cáncer específico.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con cierto grado de proliferación celular anormal. En determinados modos de realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

El término "quimérico", cuando hace referencia a anticuerpos, se refiere a un anticuerpo en el que una porción de una cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga con un anticuerpo de una especie (por ejemplo, ratón) o clase o subclase de anticuerpos, mientras la porción restante es idéntica a u homóloga con un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, humana) o clase o subclase de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable procedentes de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

Como se usa en el presente documento, el término "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se refiere a los residuos aminoacídicos de un dominio variable de anticuerpo que son necesarios para la unión a antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR₁, CDR₂ y CDR₃.

5 Como se usa en el presente documento, el término "molécula de diacuerpo" se refiere a un complejo de dos o más proteínas o cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una al menos un dominio V_L y uno V_H o fragmento del mismo, en la que están comprendidos ambos dominios en una única cadena polipeptídica. En determinados modos de realización una "molécula de diacuerpo" incluye moléculas que comprenden un dominio Fc bisagra o un Fc. Dichas cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, una "molécula de diacuerpo" incluye
10 dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio V_L como V_H. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar enlazadas de manera covalente a al menos otro péptido del multímero mediante enlaces disulfuro intercatenarios.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a una afección en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por lesión orgánica, tisular y/o celular provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propios órganos, tejidos y/o células. El término "enfermedad inflamatoria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno inflamatorio" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con la
20 inflamación. Además, la inflamación puede estar provocada o no por un trastorno autoinmunitario. De esta manera, determinados trastornos se pueden caracterizar tanto como trastornos autoinmunitarios como inflamatorios.

25 Como se usa en el presente documento, el término "célula efectora" se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no están limitadas a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos grandes granulares, células de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (NK), y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

30 El término "célula efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un ligando o receptor Fc. Un anticuerpo puede tener una o más funciones efectoras. Los ejemplos no limitantes de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), unión de C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), opsonización, opsonofagocitosis, unión celular y formación de rosetas. Las funciones efectoras incluyen tanto las que funcionan tras la unión de un antígeno y las que funcionan independiente de la unión a antígeno.

35 Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a la porción de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que se une inmunoespecíficamente por un anticuerpo. Un epítipo puede tener actividad inmunogénica, de tal manera que suscite una respuesta de producción de anticuerpos en un animal. La capacidad de un epítipo de unirse inmunoespecíficamente a un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante un inmunoanálisis. Los epítipos no tienen que ser necesariamente inmunogénicos.

40 Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan en el presente documento para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Un FcR ejemplar es un FcR humano de secuencia natural. Un FcR puede ser uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores, por ejemplo, hay al menos dos receptores FcγRII conocidos, FcγRIIA y FcγRIIB. El término FcR también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto.

45 Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana está definida para expandirse desde Cys226 al extremo carboxiterminal. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, C_{H2} y C_{H3}. El dominio C_{H2} de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "Cγ2") se extiende normalmente desde el aminoácido 231 al aminoácido 338, y el dominio C_{H3}
50 de una región Fc de IgG humana se extiende normalmente desde los aminoácidos 342 a 447.

55 El término "sitio de glucosilación" se refiere a un residuo o residuos aminoacídicos que son reconocidos por una célula de mamífero como una localización para la unión de residuos de azúcar. Los residuos aminoacídicos a los que se unen los hidratos de carbono, tales como los oligosacáridos, son generalmente residuos de asparagina (enlace N), serina (enlace O) y treonina (enlace O). Los sitios específicos de unión tienen normalmente una secuencia característica de aminoácidos, denominada "secuencia de sitio de glucosilación". La secuencia de sitio de glucosilación para la glucosilación por enlace N es: Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquiera de los aminoácidos convencionales distintos de prolina. La región Fc de la IgG humana tiene dos sitios de glucosilación por enlace N, uno en cada uno de los dominios C_{H2}, en la asparagina en la posición 297 (Asn 297).

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta HAMA" se refiere a la respuesta de anticuerpos humanos antimurinos, que es una respuesta inmunogénica perjudicial que se produce cuando un sistema inmunitario humano reconoce un anticuerpo murino como extraño y lo ataca. Una respuesta HAMA puede provocar choque tóxico o muerte. Los anticuerpos quiméricos y humanizados reducen la probabilidad de una respuesta HAMA disminuyendo las porciones no humanas de anticuerpos administrados, pero todavía hay potencial para una respuesta inmunitaria de respuesta de anticuerpos humanos antihumanos ("respuesta HAAH") frente a dichos anticuerpos.

Los términos "cadena pesada", "cadena ligera" ("C_L"), "región variable de la cadena ligera" ("V_L"), "región variable de la cadena pesada" ("V_H"), "región estructural" ("FR"), "dominio constante de la cadena pesada" ("C_H") "dominio constante de la cadena ligera" ("C_L") se refieren a los dominios en inmunoglobulinas naturales y a los correspondientes dominios de proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes), (por ejemplo, anticuerpos humanizados). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. La inmunoglobulina natural se expresa normalmente como una glucoproteína de aproximadamente 150 kDa, aunque también se puede producir IgG en una forma no glucosilada. La porción aminoterminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. La porción carboxiterminal ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un único dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. De esta manera, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG natural es N-V_L-C_L-C y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es N-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-C (donde H es la región bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los residuos en contacto con el antígeno y los segmentos no CDR, denominados segmentos estructurales, que conservan la estructura y determinan la posición de los bucles de las CDR. De esta manera, los dominios V_L e V_H tienen la estructura N-FR₁-CDR₁-FR₂-CDR₂-FR₃-CDR₃-FR₄-C.

Como se usa en el presente documento, el término ácido nucleico "heterógeno" denota ADN, ARN, etc. que se introduce en una célula huésped. El ácido nucleico puede proceder de cualquiera de una variedad de fuentes, incluyendo 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 como la célula del receptor o huésped o un polinucleótido de un tipo celular diferente, por ejemplo, de un mamífero o planta, y opcionalmente puede incluir genes de selección o marcador, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a la temperatura, etc.

El término "región bisagra" se define generalmente como expandida desde Glu216 a Pro230 de IgG1 humana. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

Como se usa en el presente documento, el término "humanizado" tiene su significado normal en la técnica. En términos generales, la humanización de un anticuerpo no humano implica sustituir las secuencias de CDR de las regiones V_L y V_H de inmunoglobulina no humana en regiones estructurales humanas. Adicionalmente, como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanizados" pueden comprender sustituciones y mutaciones adicionales en CDR y/o regiones estructurales introducidas para incrementar la afinidad o para otros propósitos. Por ejemplo, la sustitución de residuos estructurales no humanos en la secuencia humana puede incrementar la afinidad. Los dominios variables resultantes tienen secuencias de CDR no humanas y secuencias estructurales precedentes de la(s) secuencia(s) estructural(es) de anticuerpo humana(s) o una secuencia consenso humana. Se puede usar individualmente o en combinación una variedad de regiones estructurales humanas diferentes como base para un anticuerpo humanizado.

Como se usa en el presente documento, el término "agente inmunomodulador" y variaciones del mismo se refiere a un agente que modula el sistema inmunitario de un huésped. En determinados modos de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunodepresor. En otros determinados modos de realización, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulante. Los agentes inmunoestimulantes incluyen, pero no están limitados a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término "se une inmuno-específicamente", se refiere a la unión específica mostrada entre un anticuerpo y el epítipo que reconoce. Dicha unión muestra típicamente una K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 1 μM, preferentemente al menos aproximadamente 0,1 μM o menos, y lo más preferentemente, 0,01 μM o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen inmuno-específicamente a proteínas con alta afinidad (por ejemplo, K_D baja).

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

Como se usa en el presente documento, el término "técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos" se refiere a la tecnología divulgada en la solicitud de patente provisional de EE. UU. con n.º 60/781.564; 60/945.523; 61/015.106; presentada el 19 de diciembre de 2007, y 61/019.051, presentada el 4 de enero de 2008; los documentos US 20040185045; US 20040197347; US 20040197866; US 20050037000; US 20050064514; US 20050215767; US 20060134709; US 20060177439; US 20070004909; US 20070036799; US 20070037216; US 20070077246; US 20070244303; US 20080044429; US 20080050371; 11/869,410; 11/952,568; la patente de EE. UU. n.º 7.112.439; los documentos WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; o PCT/US07/86793.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" 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 excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades inferiores, y el término "anticuerpo policlonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos heterogéneos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único epítipo. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El término "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

Como se usa en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias nucleotídicas" 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 de ADN/ARN híbridas y análogos de moléculas de ADN o ARN. Se pueden generar dichos análogos, por ejemplo, usando análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no están limitados a, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que aportan atributos beneficiosos a las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada para cruzar las membranas celulares. Las secuencias nucleotídicas o ácidos nucleicos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, pueden contener ambas porciones monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener porciones tricatenarias, pero preferentemente es ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia sustancial" se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias (por ejemplo, dominios) que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de residuos aminoacídicos, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % de identidad cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima. La identidad de secuencia entre dos secuencias similares (por ejemplo, regiones variables de anticuerpo) se puede medir mediante algoritmos, tales como el de Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 [algoritmo de homología local], Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443 [algoritmo de alineación por homología], Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 85:2444 [búsqueda de procedimiento de similitud], o Altschul *et al*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 [algoritmo BLAST]. Al usar cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, se usan los parámetros predeterminados (para longitud de ventana, penalización por hueco, etc.) Se afirma que una secuencia aminoacídica es "sustancialmente similar a" una segunda secuencia cuando el grado de identidad de secuencia es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica. Se afirma que una secuencia de ácido nucleico es "sustancialmente similar a" una segunda secuencia cuando: (1) el grado de identidad de secuencia es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica, o bien la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente un 70 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, o incluso al menos aproximadamente un 95 % idéntica a la del polipéptido codificado por la segunda secuencia. Las secuencias que son sustancialmente idénticas también son sustancialmente similares.

Cuando se hace referencia a los anticuerpos, la asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con Kabat, *Sequences Of Proteins Of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)*. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat, y se refiere a la numeración del anticuerpo EU IgG1 humano.

B. Anticuerpos

La presente invención engloba particularmente polipéptidos y anticuerpos humanizados ("h") y quiméricos ("Ch") que se unen específicamente al complejo BCR, y más preferentemente al complejo BCR humano. Preferentemente, los anticuerpos tienen afinidad de unión potenciada por el complejo BCR, y más preferentemente los anticuerpos tienen función efectora potenciada, ambas comparadas con un anticuerpo para el complejo BCR ("BCC") natural. En modos de realización preferentes, dichos anticuerpos quiméricos o humanizados son versiones quiméricas y humanizadas de los anticuerpos murinos anti-complejo BCR BCC1 y BCC2, designados "ChBCC" o "hBCC", respectivamente. Los polipéptidos y anticuerpos quiméricos y humanizados tienen afinidad de unión potenciada por

ES 2 589 912 T3

el complejo BCR, en comparación con los anticuerpos BCC1 y BCC2 naturales, y pueden comprender variantes de Fc u otras modificaciones.

En el presente documento se divulgan las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias aminoacídicas de las regiones variables de los anticuerpos BCC1 y BCC2 (en el presente documento denominados colectivamente "BCC"). Estas secuencias aminoacídicas y de ácido nucleico se presentan a continuación:

5

Secuencia de ácido nucleico de V_H de BCC1 (SEQ ID NO: 1):

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcttgcaagg	cttctggcta	caccttcacc	agctactgga	tgaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgaatg	gattggatg	gttgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacaa	ggccacattg	actgttgaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagagctatg	300
ggctactggg	gtcaaggaac	ctcagtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de V_H de BCC1 (SEQ ID NO: 2):

QVQLQQPGAE	LVRPGASVKL	SCKASGYTFT	SYWMNWVKQR	PGQGLEWIGM	VDPSDSETHY	60
NQMFKDKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARAM	GYWGQTSVT	VSS	113

10 Secuencia de ácido nucleico de V_L de BCC1 (SEQ ID NO: 3):

gatgtttgta	tgaccagac	tccactcact	ttgtcgggta	acattggaca	accagcctcc	60
atctcttgta	agtcaagtca	gagcctctta	gatactgatg	gaaagacata	tttgaattgg	120
ttgttacaga	ggccaggcca	gtctccaaac	cgctaatact	atctggtgtc	taaactggac	180
tctggagtcc	ctgacagggt	caactggcagt	ggatcagggg	cagatttcac	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tttgggaatt	tattattgct	ggcaaggtac	acattttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaa			336

Secuencia aminoacídica de V_L de BCC1 (SEQ ID NO: 4):

DVVMTQTPLT	LSVNIGQPAS	ISCKSSQSL	DTDGKTYLNW	LLQRPGQSPN	RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFTGS	GSQTDFTLKI	SRVEAEDLGI	YYCWQGTFFP	LTFGAGTKLE	LK	112

Secuencia de ácido nucleico de V_L de BCC2 (SEQ ID NO: 5):

gatgtttggt	tgaccagac	tccactcact	ttgtcgggta	ccattggaca	accagcctcc	60
atctcttgta	agtcaagtca	gagcctctta	gatagtgatg	gaaagacata	tttgaattgg	120
ttgttacaga	ggccagggtca	gtctccaaag	cgctaatact	atctggtgtc	taaactggac	180
tctggagtcc	ctgacagggt	caactggcagt	ggatcagggg	cagatttcac	actgaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgagga	tttgggagtt	tattattgct	ggcaaggtac	acattttccg	300
ctcacgttcg	gtgctgggac	caagctggag	ctgaaa			336

15

Secuencia aminoacídica de V_L de BCC2 (SEQ ID NO: 6):

DVVLTQTPLT	LSVTIGQPAS	ISCKSSQSL	DSDGKTYLNW	LLQRPGQSPK	RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFTGS	GSQTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YYCWQGTFFP	LTFGAGTKLE	LK	112

Secuencia de ácido nucleico de V_H de BCC2 (SEQ ID NO: 7):

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcttgcaagg	cttctggcta	caccttcacc	agctactgga	tgaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgaatg	gattggatg	attgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagagctatg	300
ggctactggg	gtcaaggaac	ctcagtcacc	gtctcctca			339

20 Secuencia aminoacídica de V_H de BCC2 (SEQ ID NO: 8):

ES 2 589 912 T3

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGM IDPSDSETHY 60
 NQMFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARAM GYWGGTSVT VSS 113

En un modo de realización preferente de la invención, se construyeron y estudiaron siete regiones variables de la cadena ligera de BCC diferentes. Las secuencias aminoacídicas y de ácido nucleico de estas regiones variables de la cadena ligera se presentan a continuación:

5 Secuencia de ácido nucleico de VL-1 de hBCC (SEQ ID NO: 9):

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga gcccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggetgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gccggaggac caagcttgag atcaaa 336

Secuencia aminoacídica de VL-1 de hBCC (SEQ ID NO: 10):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLD DSDGKTYLNV FQQRPGQSPR RLIYLVSKLD 60
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGKLE IK 112

Secuencia de ácido nucleico de VL-2 de hBCC (SEQ ID NO: 11):

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga gcccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggetgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gccggaggac caagcttgag atcaaa 336

10

Secuencia aminoacídica de VL-2 de hBCC (SEQ ID NO: 12):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLD DSDGKTYLNV FLQRPQSPR RLIYLVSKLD 60
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGKLE IK 112

Secuencia de ácido nucleico de VL-3 de hBCC (SEQ ID NO: 13):

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga gcccaggcca atctccaaag cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggetgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gccggaggac caagcttgag atcaaa 336

15 Secuencia aminoacídica de VL-3 de hBCC (SEQ ID NO: 14):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLD DSDGKTYLNV FQQRPGQSPK RLIYLVSKLD 60
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGKLE IK 112

Secuencia de ácido nucleico de VL-4 de hBCC (SEQ ID NO: 15):

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga gcccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggetgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gccggaggac caagcttgag atcaaa 336

Secuencia aminoacídica de VL-4 de hBCC (SEQ ID NO: 16):

ES 2 589 912 T3

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGTKLE IK	112

Secuencia de ácido nucleico de VL-5 de hBCC (SEQ ID NO: 17):

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttctgcaga gcccaggcca atctccaaag cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacattca ccccaaacac caagcttgaq atcaaa	336

Secuencia aminoacídica de VL-5 de hBCC (SEQ ID NO: 18):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FLQRPQSPK RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGTKLE IK	112

5

Secuencia de ácido nucleico de VL-6 de hBCC (SEQ ID NO: 19):

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttctgcaga gcccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gccggaggac caagcttgaq atcaaa	336

Secuencia aminoacídica de VL-6 de hBCC (SEQ ID NO: 20):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FLQRPQSPN RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGTKLE IK	112

10 Secuencia aminoacídica de VL de chBCC1 (SEQ ID NO: 37):

DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPQSPN RLIYLVSKLD	60
SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTTHFP LTFGAGTKLE LK	112

15 En la figura 1 de la presente divulgación está representada una comparación entre las regiones variables de la cadena ligera (V_L) de un anticuerpo BCC2 natural (SEQ ID NO: 6) y un anticuerpo BCC1 quimérico (SEQ ID NO: 37) y un anticuerpo BCC2 humanizado (SEQ ID NO: 10). Aunque se puede observar que se ha cambiado un número de residuos en estas secuencias quiméricas y humanizadas particulares, no es necesario modificar todos o la mayoría de estos residuos cuando se generen mediante ingeniería los polipéptidos y anticuerpos quiméricos y humanizados. Para la región variable de la cadena ligera, es preferente modificar uno o más residuos en las posiciones 37 y 45, que se advierten en la figura 1 en **negrita** y subrayando los residuos (los números Kabat se muestran debajo de la secuencia para estos residuos). Preferentemente, una V_L de BCC humanizado comprende: (1) una sustitución Q37L, o (2) una sustitución R45N o R45K, o ambas (1) y (2), aunque se puede hacer un número de distintas modificaciones (es decir, modificaciones distintas de sustituciones). La figura 2 es un gráfico que representa diversos residuos modificados en las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos BCC humanizados de la divulgación, pudiéndose hacer cualquiera de las modificaciones en los anticuerpos y polipéptidos de la divulgación.

25 En diversos modos de realización, los anticuerpos comprenden una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que es una V_L de BCC humanizado, que tiene preferentemente una sustitución Q37L, o una sustitución R45N o R45K, o ambas. Se divulga que los anticuerpos comprenden una V_L de inmunoglobulina que es una V_L de BCC humanizado, que preferentemente comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 20, o está codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. Se divulga que los anticuerpos comprenden una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una V_L de BCC humanizado, comprendiendo preferentemente la cadena ligera una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19.

ES 2 589 912 T3

Se divulga que los anticuerpos pueden comprender una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que es una V_L de BCC quimérico que tiene preferentemente una sustitución Q37L, o una sustitución R45N o R45K, o ambas. En un modo de realización preferente, los anticuerpos comprenden una V_L de inmunoglobulina que es una V_L de BCC quimérico que comprende preferentemente la secuencia de SEQ ID NO: 37.

- 5 Se construyeron y estudiaron nueve regiones variables de la cadena pesada de BCC diferentes. Las secuencias aminoacídicas y de ácido nucleico de estas regiones variables de la cadena pesada se presentan a continuación:

Secuencia de ácido nucleico de VH-1 de hBCC (SEQ ID NO: 21):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg	attgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaagggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-1 de hBCC (SEQ ID NO: 22):

	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWMGM	IDPSDSETHY	60
10	NQMFKDRVTM	TTDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTTVT	VSS	113

Secuencia de ácido nucleico de VH-2 de hBCC (SEQ ID NO: 23):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatcggaatg	attgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaagggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-2 de hBCC (SEQ ID NO: 24):

	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWIGM	IDPSDSETHY	60
	NQMFKDRVTM	TTDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTTVT	VSS	113

- 15 Secuencia de ácido nucleico de VH-3 de hBCC (SEQ ID NO: 25):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg	attgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacaa	agccaccctg	accgtagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaagggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-3 de hBCC (SEQ ID NO: 26):

	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWMGM	IDPSDSETHY	60
	NQMFKDKATL	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTTVT	VSS	113

Secuencia de ácido nucleico de VH-4 de hBCC (SEQ ID NO: 27):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg	attgatcctt	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacag	agtcaccatg	accgtagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaagggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

20

ES 2 589 912 T3

Secuencia aminoacídica de VH-4 de hBCC (SEQ ID NO: 28):

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWMGM	IDPSDSETHY	60
NQMFKDRVIM	TVDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTIVT	VSS	113

Secuencia de ácido nucleico de VH-5 de hBCC (SEQ ID NO: 29):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg	attgacccct	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacag	agtcaccatg	accgtagaca	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaaggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

5 Secuencia aminoacídica de VH-5 de hBCC (SEQ ID NO: 30):

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWMGM	IDPSDSETHY	60
NQMFKDRVIM	TVDKSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTIVT	VSS	113

Secuencia de ácido nucleico de VH-6 de hBCC (SEQ ID NO: 31):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaatg	attgacccct	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaaaagt	tcaaggacag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaaggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-6 de hBCC (SEQ ID NO: 32):

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWMGM	IDPSDSETHY	60
NQKFKDRVIM	TTDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTIVT	VSS	113

10

Secuencia de ácido nucleico de VH-7 de hBCC (SEQ ID NO: 33):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatcggaatg	attgacccct	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaaaagt	tcaaggacag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaaggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-7 de hBCC (SEQ ID NO: 34):

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWIGM	IDPSDSETHY	60
NQKFKDRVIM	TTDTSTSTAY	MELRSLRSDD	TAVYYCARAM	GYWGQGTIVT	VSS	113

15 Secuencia de ácido nucleico de VH-8 de hBCC (SEQ ID NO: 35):

caggttcagc	tgggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggcgcctc	agtgaaggtc	60
tcttgcaagg	cttctgggta	cacctttacc	agctactgga	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatcggaatg	attgacccct	cagacagtga	aactcactac	180
aatcaaatgt	tcaaggacag	agtcaccatg	accgtagaca	catccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagctatg	300
ggctactggg	ggcaaggac	cacggtcacc	gtctcctca			339

Secuencia aminoacídica de VH-8 de hBCC (SEQ ID NO: 36):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM IDPSDSETHY 60
 NQMFKDRVTM TVDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS 113

Secuencia aminoacídica de VH de chBCC1 (SEQ ID NO: 38):

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWKQR PGQGLEWIGM VDPSDSETHY 60
 NQMFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS 113

5 En la figura 3 de la presente divulgación está representada una comparación entre las regiones variables de la
 cadena pesada (V_H) de un anticuerpo BCC2 natural (SEQ ID NO: 8) y un anticuerpo BCC1 quimérico (SEQ ID NO:
 38) y un anticuerpo BCC2 humanizado (SEQ ID NO: 22). Aunque se puede observar que se ha cambiado un número
 de residuos en estas secuencias quiméricas y humanizadas particulares, no es necesario modificar todos o la
 mayoría de estos residuos cuando se generen mediante ingeniería los polipéptidos y anticuerpos quiméricos y
 humanizados. Para la región variable de la cadena pesada, es preferente modificar uno o más residuos en las
 10 posiciones 48, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 73, que se advierten en la figura 3 en negrita y subrayando los residuos
 (los números Kabat se muestran debajo de la secuencia para estos residuos). En un modo de realización preferente
 de la divulgación, una V_H de BCC humanizado o quimérico comprende una o más de las siguientes modificaciones:
 M48I, M62K, R66K, V67A, M69L, T71V o T71V y T73K, cualquiera de las modificaciones mostradas en la figura 2, o
 cualquier otra modificación (es decir, una modificación distinta de sustitución).

15 Los anticuerpos de la divulgación comprenden una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que
 es una V_H de BCC humanizado, que tiene preferentemente una o más modificaciones M48I, M62K, R66K, V67A,
 M69L, T71V o T71V y T73K En un modo de realización preferente de la divulgación, los anticuerpos comprenden
 una V_H de inmunoglobulina que es una V_H de BCC humanizado, que comprende preferentemente la secuencia de
 20 SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34
 o SEQ ID NO: 36, o está codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ
 ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 35. En otros modos de
 realización de la divulgación, los anticuerpos comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende
 una V_H de BCC humanizado, comprendiendo preferentemente la cadena pesada una secuencia seleccionada del
 25 grupo que consiste en SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID
 NO: 32, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36, o está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada del
 grupo que consiste en SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID
 NO: 31, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 35.

30 Los anticuerpos de la divulgación comprenden una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que
 es una V_H de BCC quimérico, que comprende preferentemente una o más modificaciones M48I, M62K, R66K, V67A,
 M69L, T71V o T71V y T73K

35 Se divulga que los anticuerpos comprenden una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que es
 una V_L de BCC humanizado o quimérico y también comprenden una región variable de la cadena pesada de
 inmunoglobulina (V_H) que es una V_H de BCC humanizado o quimérico. Los anticuerpos pueden comprender
 cualquier combinación de las regiones V_L y V_H descritas en el presente documento, por ejemplo, una V_L natural con
 una V_H humanizada, una V_L natural con una V_H quimérica, una V_L humanizada con una V_H humanizada, una V_L
 humanizada con una V_H quimérica, una V_L humanizada con una V_H natural, una V_L quimérica con una V_H
 humanizada, una V_L quimérica con una V_H quimérica o una V_L quimérica con una V_H natural. Cada una de estas
 40 combinaciones se puede variar adicionalmente por el entendimiento de en determinados modos de realización, la
 región V_L puede ser una versión (quimérica, humanizada o natural) de un anticuerpo BCC1, y la región V_H puede ser
 una versión (quimérica, humanizada o natural) de un anticuerpo BCC2, o viceversa.

45 Se divulga que los anticuerpos comprenden una de las siguientes combinaciones: VL-1 de hBCC / VH de chBCC,
 VL-2 de hBCC / VH de chBCC, VL-3 de hBCC / VH de chBCC, VL-4 de hBCC / VH de chBCC, VL de chBCC / VH-1
 de hBCC, VL de chBCC / VH-2 de hBCC, VL de chBCC / VH-3 de hBCC, VL de chBCC / VH-4 de hBCC, VL de
 chBCC / VH-5 de hBCC, VL de chBCC / VH-6 de hBCC, VL-4 de hBCC / VH-2 de hBCC, VL-4 de hBCC / VH-7 de
 hBCC VL-4 de hBCC / VH-8 de hBCC, VL-6 de hBCC / VH-2 de hBCC, VL-6 de hBCC / VH-7 de hBCC o VL-6 de
 hBCC / VH-8 de hBCC. En un modo de realización preferente, los anticuerpos comprenden una de las
 combinaciones de las regiones V_L y V_H expuestas en la tabla 2.

50

Tabla 2: combinaciones ejemplares de las regiones VL y VH			
Región variable de la cadena ligera(V _L)	Región variable de la cadena pesada (V _H)		
	Natural	Humanizada	Quimérica
Natural	—	Una V _L seleccionada de VL de BCC1 o VL de BCC2 y una V _H seleccionada de VH-1 de hBCC, VH-2 de hBCC, VH-3 de hBCC, VH-4 de hBCC, VH-5 de hBCC, VH-6 de hBCC, VH-7 de hBCC, o VH-8 de hBCC	Una V _L seleccionada de VL DE BCC1 o VL de BCC2 y una V _H seleccionada de VH de chBCC1 o VH de chBCC2
Humanizada	Una V _L seleccionada de VL-1 de hBCC, VL-2 de hBCC, VL-3 de hBCC, VL-4 de hBCC, VL-5 de hBCC o VL-6 de hBCC, y una V _H seleccionada de VH de BCC1o VH de BCC2	Una V _L seleccionada de VL-1 de hBCC, VL-2 de hBCC, VL-3 de hBCC, VL-4 de hBCC, VL-5 de hBCC o VL-6 de hBCC y una V _H seleccionada de VH-1 de hBCC, VH-2 de hBCC, VH-3 de hBCC, VH-4 de hBCC, VH-5 de hBCC, VH-6 de hBCC, VH-7de hBCC o VH-8 de hBCC	Una V _L seleccionada de VL-1 de hBCC, VL-2 de hBCC, VL-3 de hBCC, VL-4 de hBCC, VL-5 de hBCC o VL-6 de hBCC y una V _H seleccionada de VH de chBCC1 o VH de chBCC2
Quimérica	Una V _L seleccionada de VL de chBCC1 o VL de chBCC2 y una V _H seleccionada de VH de BCC1 o VH de BCC2	Una V _L seleccionada de VL de chBCC1 o VL de chBCC2 y una V _H seleccionada de VH-1 de hBCC, VH-2 de hBCC, VH-3 de hBCC, VH-4 de hBCC, VH-5 de hBCC, VH-6 de hBCC, VH-7 de hBCC o VH-8 de hBCC	Una V _L seleccionada de VL de chBCC1 o VL de chBCC2 y una V _H seleccionada de VH de chBCC1 o VH de chBCC2

Los polipéptidos (especialmente anticuerpos) contemplados por la presente invención se pueden encontrar en un complejo con otro o con otros polipéptidos no inmunoglobulínicos, (por ejemplo, enzimas, hormonas, proteínas estructurales, etc.). Por ejemplo, un modo de realización puede proporcionar un complejo polipéptídico que comprende dos polipéptidos, en el que uno de dichos polipéptidos comprende una cadena pesada y el otro polipéptido comprende una cadena ligera de variante, o en el que ambos polipéptidos comprenden las mismas secuencias. La formación de complejos puede estar mediada por cualquier técnica adecuada, incluyendo mediante dimerización/multimerización en un dominio de dimerización/multimerización, tal como los descritos en el presente documento o interacciones covalentes (tales como a través de un enlace disulfuro) (que en algunos contextos es parte de un dominio de dimerización, por ejemplo, un dominio de dimerización puede contener una secuencia de cremallera de leucinas y una cisteína). En otro modo de 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 el presente documento. Una composición que comprende un polinucleótido o polipéptido puede estar en forma de un kit o un artículo de fabricación (opcionalmente envasado con instrucciones, tampones, etc.).

También se contempla que se puedan preparar variantes polipeptídicas (y en particular variantes de anticuerpos). Las variantes polipeptídicas pueden poseer modificaciones de secuencia (por ejemplo, sustituciones, deleciones y/o adiciones) en las posiciones deseadas en sus secuencias aminoacídicas con respecto a la secuencia aminoacídica natural. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios aminoacídicos pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo o polipéptido, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana. En un modo de realización preferente, las variantes polipeptídicas y de anticuerpos son variantes de la región Fc.

Las variantes pueden tener misma actividad o alterada en comparación con un polipéptido o anticuerpo natural. Por ejemplo, puede ser deseable que la variante tenga la misma actividad, pero se modifique de una manera de modo que sea más estable o tenga una semivida más larga *in vivo*, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con

seroalbúmina o un epítipo de unión a un receptor de rescate, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.739.277. O, por ejemplo, puede ser deseable que un anticuerpo tenga una afinidad de unión incrementada a antígeno, pero la misma función efectora como anticuerpo natural, o puede ser deseable que un anticuerpo tenga la misma afinidad de unión a antígeno, pero una función efectora disminuida. La actividad puede ser sometida a prueba, por ejemplo, usando ensayos *in vitro*, tales como ensayos de ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayos de unión de proteína radiomarcada (RIA) o ensayos de inmunoprecipitación.

Se pueden efectuar modificaciones sustanciales en la identidad inmunológica o función seleccionando modificaciones que difieren significativamente en su efecto de conservación de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la modificación, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. También se puede emplear análisis de aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua, por ejemplo, como se describe por Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085. Entre los aminoácidos de barrido preferentes están los aminoácidos neutros relativamente pequeños, tales como alanina, glicina, serina y cisteína. Entre este grupo, la alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferente, porque es el aminoácido más común, con frecuencia se encuentra tanto en posiciones ocultas como 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, se puede usar un aminoácido isotérico. Adicionalmente, se puede sustituir cualquier residuo de cisteína no implicado en conservar la propia conformación del anticuerpo o polipéptido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento atípico. Sin embargo, en determinadas circunstancias, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo o polipéptido para mejorar su estabilidad.

B1. Variantes de dominios Fc

Los polipéptidos de la presente invención pueden tener dominios Fc de variante. La modificación del dominio Fc normalmente da lugar a un fenotipo alterado, por ejemplo, semivida sérica 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, por ejemplo, para incrementar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en determinados casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo, pero no la muerte de las células que llevan un antígeno diana. Es generalmente deseable una función efectora incrementada al dirigirse a células indeseables, tales como células exógenas o tumorales, donde los FcγR se expresan en niveles bajos, por ejemplo, linfocitos B específicos de tumor con bajos niveles de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no Hodgkiniano, LLC y linfoma de Burkitt). En dichos modos de realización, las moléculas de la invención con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección, donde se desea una eficacia potenciada de la actividad de función efectora.

En determinados modos de realización, las moléculas de la invención comprenden una o más modificaciones en los aminoácidos del dominio Fc, que reducen la afinidad y avidéz de la región Fc y, de esta manera, la molécula de la invención, para uno o más receptores FcγR. En otros modos de realización, las moléculas de la invención comprenden una o más modificaciones en los aminoácidos de la región Fc, que incrementan la afinidad y avidéz de la región Fc y, de esta manera, la molécula de la invención, para uno o más receptores FcγR. En otros modos de realización, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante confiere o media la actividad ADCC incrementada y/o una unión incrementada a FcγRIIA, con respecto a una molécula que no comprenda ningún dominio Fc o que comprenda un dominio Fc natural. En modos de realización alternativos, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante confiere o media la actividad ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión incrementada a FcγRIIB, con respecto a una molécula que no comprenda ningún dominio Fc o que comprenda un dominio Fc natural.

En algunos modos de realización, la invención engloba moléculas que comprenden una región Fc de variante, no mostrando la región Fc de variante una unión detectable a cualquier FcγR, con respecto a una molécula comparable que comprenda la región Fc natural. En otros modos de realización, la invención engloba moléculas que comprenden una región Fc de variante, uniéndose únicamente la región Fc de variante a un FcγR único, preferentemente uno de FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIA.

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender afinidades alteradas por un receptor Fcγ inhibitorio y/o de activación. En un modo de realización, el anticuerpo o polipéptido comprende una región Fc de variante que tiene afinidad incrementada por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. En otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región Fc de variante, que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad incrementada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. Aún en otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región Fc de variante que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural. Todavía en otro modo de realización, los polipéptidos de la presente invención comprenden

una región Fc de variante que tiene afinidad invariable por FcγRIIB y afinidad disminuida (o incrementada) por FcγRIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc natural.

5 En determinados modos de realización, la invención engloba inmunoglobulinas que comprenden una región Fc de variante con una afinidad alterada por FcγRIIA y/o FcγRIIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

10 En un modo de realización preferente, la alteración de la afinidad o función efectora es al menos 2 veces, preferentemente al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces, con respecto a una molécula comparable que comprenda una región Fc natural. En otros modos de realización de la invención, la región Fc de variante se une inmunoespecíficamente uno o más FcR con al menos un 65 %, preferentemente al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 100 %, un 125 %, un 150 %, un 175 %, un 200 %, un 225 % o un 250 % de afinidad mayor con respecto a una molécula que comprenda una región Fc natural. Dichas medidas pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro*, y en un modo de realización preferente son ensayos *in vitro*, tales como ensayos de resonancia de plasmón superficial o de ELISA.

20 En modos de realización diferentes, las moléculas comprenden un dominio Fc de variante en los que dicha variante actúa como agonista de al menos una actividad de un receptor FcγR, o actúa como antagonista de al menos una actividad de un receptor FcγR. En un modo de realización preferente, las moléculas comprenden una variante que actúa como agonista (o actúa como antagonista) de una o más actividades de FcγRIIB, por ejemplo, la señalización mediada por el receptor de linfocitos B, la activación de los linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, la entrada de calcio intracelular de linfocitos B, la evolución del ciclo celular, la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI, la fosforilación de FcγRIIB, la incorporación de SHIP, la fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o la actividad de una o más moléculas subsiguientes (por ejemplo, MAP cinasa, JNK, p38 o Akt) en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otro modo de realización, las moléculas comprenden una variante actúa como agonista (o actúa como antagonista) de una o más actividades de FcεRI, por ejemplo, la activación de mastocitos, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina.

30 En determinados modos de realización, las moléculas comprenden un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Los diferentes isotipos de IgG muestran diferentes propiedades físicas y funcionales incluyendo semivida sérica, fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, etc.) debidas a las diferencias en las secuencias aminoacídicas de sus dominios Fc y/o bisagra, por ejemplo, como se describe en Flesch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 88:9036-9040; o Brüggemann *et al.* (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de dominio Fc de variante se puede usar solo o en combinación con una modificación aminoacídica para influir en la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. En combinación, la modificación aminoacídica y la región Fc y/o bisagra de IgG pueden mostrar una funcionalidad similar (por ejemplo, afinidad incrementada por FcγRIIA) y pueden actuar de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica para modificar la funcionalidad efectora en la molécula de la invención, con respecto a una molécula de la invención que comprenda una región Fc natural. En otros modos de realización, la modificación aminoacídica y la región Fc de IgG pueden mostrar funcionalidad opuesta (por ejemplo, afinidad incrementada y disminuida por FcγRIIA, respectivamente) y pueden actuar para reducir o moderar selectivamente una funcionalidad específica en la molécula de la invención, con respecto a una molécula de la invención que no comprenda ninguna región Fc o que comprenda una región Fc natural del mismo isotipo.

50 En un modo de realización específico preferente, las moléculas comprenden una región Fc de variante, en el que dicha región Fc de variante comprende al menos una modificación aminoacídica con respecto a una región Fc natural, de tal manera que dicha molécula tenga una afinidad alterada por un FcR, a condición de que dicha región Fc de variante no tenga una sustitución en las posiciones que establecen un contacto directo con FcγR en base al análisis cristalográfico y estructural de las interacciones Fc-FcR, tales como las divulgadas por Sondermann *et al.* (2000) Nature 406:267-73. Los ejemplos de posiciones en la región Fc que establecen un contacto directo con FcγR son los residuos aminoacídicos 234-239 (región bisagra), los residuos aminoacídicos 265-269 (bucle B/C), los residuos aminoacídicos 297-299 (bucle C'/E) y los residuos aminoacídicos 327-332 (bucle F/G). En algunos modos de realización, las moléculas de la invención comprenden regiones Fc de variante que comprenden la modificación de al menos un residuo que no establece un contacto directo con un FcγR en base al análisis cristalográfico y estructural, por ejemplo, no está en el sitio de unión a Fc-FcγR.

60 Los dominios Fc de variante son bien conocidos en la técnica, y se puede usar cualquier variante de Fc conocida en la presente invención para conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de la invención que comprenda un dominio Fc (o porción del mismo) como se somete a ensayo funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de macrófagos o dependiente de NK. Por ejemplo, en la técnica de tecnologías para la

ingeniería de anticuerpos se divulgan variantes de dominios Fc identificadas por alterar la función efectora y se puede usar cualquier variante adecuada divulgada en la misma en las presentes moléculas.

5 En determinados modos de realización, las moléculas comprenden una región Fc de variante, que tiene una o más modificaciones aminoacídicas en una o más regiones, alterando la(s) modificación(modificaciones) (con respecto a una región Fc natural) la proporción de afinidades de la región Fc de variante frente a un FcγR de activación (tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) con respecto a un FcγR de inhibición (tal como FcγRIIB):

$$\text{Proporción de afinidades} = \frac{\text{Cambio natural con respecto a variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activación}}}{\text{Cambio natural con respecto a variante en la afinidad con respecto a Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibición}}}$$

10 Cuando una variante de Fc tiene una proporción de afinidades mayor que 1, los procedimientos de la invención tienen un uso particular al proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, trastorno o infección, o la mejora de un síntoma de los mismos, cuando se desea una eficacia potenciada de la función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Cuando una variante de Fc tiene una proporción de afinidades menor que 1, los procedimientos de la invención tienen un uso particular al proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno, o la mejora de un síntoma de los mismos, cuando se desea una eficacia disminuida de la función de células efectoras mediada por FcγR, por ejemplo, trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. La tabla 3 enumera las mutaciones únicas, dobles, triples, cuádruples y quintuples ejemplares, si su proporción de afinidades es mayor que o menor que 1. Los datos de unión específica para diversas mutaciones se enumeran en la tabla 4, y se puede encontrar más información relativa a estas mutaciones encontrar en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos.

15

Tabla 3: mutaciones únicas y múltiples ejemplares enumeradas por proporción de afinidades

Prop.	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		

ES 2 589 912 T3

Tabla 4: información de unión detallada para las 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 a CD16; Unión disminuida a 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
F243LP247LN421K	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
P247LD270EN421K	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
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 a CD16; Unión ampliamente disminuida a CD32B					
R292P		0,64	0,25		2,56
R292P F243L		0,6	0,12		5,00
Clase III: Unión incrementada a CD16; Unión invariable a CD32B					
F243I R292P Y300L V305I P396L	10,9	3,12	1,05	10,4	2,97

ES 2 589 912 T3

F243L R292P Y300L P396L	0,06	5,62	1,07	9,40	5,25
R292P V305I P396L	1,85	1,90	0,92	2,01	2,07
Clase IV: Unión ampliamente incrementada a CD16; Unión incrementada a 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 invariable a CD16; Unión incrementada a CD32B					
R255L P396L	1,09		2,22	0,49	
Y300L	1,01		1,18		0,99
Clase VI: Unión incrementada a CD16; Unión ampliamente incrementada a 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
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 a CD16; Unión invariable / incrementada a CD32B					
D270E G316D P396L R416G		0,94	1,07		0,88

5 En otros modos de realización, las moléculas comprenden una región Fc de variante que tiene una o más sustituciones aminoacídicas, alterando las sustituciones (con respecto a una región Fc natural) la unión de la región Fc de variante, por ejemplo, potenciando la unión a un FcγR de activación (tal como FcγRIIA o FcγRIIIA) y/o reduciendo la unión a un FcγR de inhibición (tal como FcγRIIB). Se generaron mediante ingeniería diversas mutaciones de Fc que tenían uno o más cambios aminoacídicos y se analizaron mediante resonancia de plasmón superficial para k_{off} , como se muestra en la tabla 5. Se determinaron las constantes de velocidad de disociación para unir los diversos FcγR mediante análisis BIAcore y se compararon directamente con las del Fc natural, con la proporción ($x = k_{off} \text{ natural} / k_{off} \text{ mutante}$) indicada en las columnas de la derecha de la tabla 5 con respecto a cada FcγR sometido a prueba.

10

Tabla 4: comparación de k_{off} de mutantes de Fc con respecto a Fc natural												
M	Cambio(s) aminoacídico(s)								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

ES 2 589 912 T3

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
<p>Abreviaturas: M, número de mutante; nd, unión no detectable; nt, no sometido a prueba. Los valores con una diferencia $\geq 80\%$ ($\geq 0,8$ veces) del natural en cualquier dirección figuran en negrita. El sombreado denota mutantes de Fc identificados directamente mediante expresión en la superficie de levaduras; todos los demás mutantes se construyeron mediante mutagénesis de sitio dirigido.</p>											

También hay extensa orientación en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos relativa a las modificaciones deseables. Las modificaciones ejemplares que pueden ser deseables en determinadas circunstancias se enumeran a continuación:

- 5 En un modo de realización específico, en regiones Fc de variante, cualquier modificación aminoacídica (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 o 330 y preferentemente uno o más de los siguientes residuos: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 o V330. En un modo de realización específico diferente, en regiones Fc de variante, cualquier modificación aminoacídica (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 y preferentemente uno o más de los siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 o L300.

- 15 En un modo de realización preferente, en regiones Fc de variante que se unen a un Fc γ R con una afinidad alterada, cualquier modificación aminoacídica (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Preferentemente, la región Fc de variante tiene cualquiera de los siguientes residuos: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 o A430.

- 20 En un modo de realización diferente, en regiones Fc de variante que se unen a un Fc γ R (por medio de su región Fc) con una afinidad reducida, cualquier modificación aminoacídica (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las

posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439.

- En un modo de realización diferente, en regiones Fc de variante que se unen a un FcγR (por medio de su región Fc) con una afinidad potenciada, cualquier modificación aminoacídica (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430. En un modo de realización diferente, en regiones Fc de variante que se unen a FcγRIIA con una afinidad potenciada, cualquiera de los siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 o A430.
- 10 En otros modos de realización, la invención engloba el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tal como las divulgadas en Jefferis *et al.* (2002) *Immunol Lett* 82:57-65; Presta *et al.* (2002) *Biochem Soc Trans* 30:487-90; Idusogie *et al.* (2001) *J Immunol* 166:2571-75; Shields *et al.* (2001) *J Biol Chem* 276:6591-6604; Idusogie *et al.* (2000) *J Immunol* 164:4178-84; Reddy *et al.* (2000) *J Immunol* 164:1925-33; Xu *et al.* (2000) *Cell Immunol* 200:16-26; Armour *et al.* (1999) *Eur J Immunol* 29:2613-24; Jefferis *et al.* (1996) *Immunol Lett* 54:101-04; Lund *et al.* (1996) *J Immunol* 157:4963-69; Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 92:11980-84; Jefferis *et al.* (1995) *Immunol Lett.* 44:111-17; Lund *et al.* (1995) *FASEB J* 9:115-19; Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537-43; Lund *et al.* (1992) *Mol Immunol* 29:53-59; Lund *et al.* (1991) *J. Immunol* 147:2657-62; Duncan *et al.* (1988) *Nature* 332:563-64; patente de EE. UU. n.ºs 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; y 7.317.091; y las publicaciones PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.
- 15 Las variantes preferentes incluyen una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 o 332.

Las variantes particularmente preferentes incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos A-AI:

- A. 228E, 228K, 228Y o 228G;
- 25 B. 230A, 230E, 230Y o 230G;
- C. 231E, 231K, 231Y, 231P o 231G;
- D. 232E, 232K, 232Y, 232G;
- E. 233D;
- F. 234I o 234F;
- 30 G. 235D, 235Q, 235P, 235I o 235V;
- H. 239D, 239E, 239N o 239Q;
- I. 240A, 240I, 240M o 240T;
- J. 243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H o 243I;
- K. 244H;
- 35 L. 245A;
- M. 247G, 247V o 247L;
- N. 262A, 262E, 262I, 262T, 262E o 262F;
- O. 263A, 263I, 263M o 263T;
- P. 264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T o 264W;
- 40 Q. 265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N o 265Q;
- R. 266A, 266I, 266M o 266T;
- S. 271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I,
271F, 271M, 271Y, 271W o 271G;
- T. 273I;
- 45 U. 275L o 275W;

ES 2 589 912 T3

- V. 281D, 281K, 281Y o 281P;
- W. 284E, 284N, 284T, 284L, 284Y o 284M;
- X. 291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I o 291G;
- Y. 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q,
5 299R, 299S, 299V, 299W o 299Y;
- Z. 302I;
- AA. 304D, 304N, 304T, 304H o 304L
- AB. 305I;
- AC. 313F;
- 10 AD. 323I;
- AE. 325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T,
325V, 325Y, 325W o 325P;
- AF. 328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A,
328E, 328F, 328H, 328M o 328N;
- 15 AG. 330L, 330Y, 330I o 330V;
- AH. 332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F,
332M, 332W, 332P, 332G o 332Y; y
- AI. 336E, 336K o 336Y.

20 Las variantes todavía más particularmente preferentes incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos 1-105:

Grupo	Variante	Grupo	Variante
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D

22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H /	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E.
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

La función efectora se puede modificar mediante técnicas, tales como las descritas en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos, o mediante otros medios. Por ejemplo, se puede introducir un residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región, dando como resultado la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento y ADCC incrementadas. Véase Caron *et al.* (1992) J. Exp Med. 176:1191-1195; y B. Shopes (1992) J. Immunol. 148:2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también se pueden preparar usando reticuladores heterobifuncionales, como se describe en Wolff *et al.* (1993) Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, se puede generar mediante ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y así tenga lisis por el complemento potenciada y capacidades de ADCC. Stevenson *et al.* (1989) Anti-Cancer Drug Design 3:219-230.

B2. Modificaciones de secuencia

Generalmente, las modificaciones de secuencia puede ser la sustitución, delección o adición de uno o más residuos en el anticuerpo o polipéptido que da como resultado un cambio en la secuencia aminoacídica en comparación con la secuencia natural. Se puede encontrar orientación para determinar qué residuo aminoacídico se puede someter a inserción, sustitución o delección sin influir adversamente en la actividad deseada comparando la secuencia del anticuerpo o polipéptido con la de las moléculas proteicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia aminoacídica hechos en regiones de homología alta. Se puede determinar la variación permitida haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a prueba las variantes resultantes para determinar la actividad mostrada por la secuencia natural madura o de longitud completa.

Las sustituciones aminoacídicas pueden implicar la sustitución conservadora o no conservadora de uno o más residuos. Dichas sustituciones son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, una sustitución conservadora supone reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades químicas y/o estructurales similares, tal como el reemplazo de una leucina con una serina. Las sustituciones no conservadoras suponen generalmente

reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades químicas y/o estructurales diferentes, por ejemplo, un aminoácido ácido (por ejemplo, Glu) se puede reemplazar con un aminoácido básico (por ejemplo, Asn).

Un tipo particularmente preferente de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano), a fin de obtener un anticuerpo de variante que tenga propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando expresión en fago. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable para generar todas las posibles sustituciones aminoacídicas en cada sitio, de esta manera, las variantes de anticuerpo generadas se expresan en fago, y entonces se criban las variantes expresadas en fago frente a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar la mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y su antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se puede seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para el desarrollo posterior.

La modificación también puede implicar la incorporación (por ejemplo, mediante sustitución o adición) de aminoácidos no naturales, por ejemplo, mediante procedimientos, tales como los descritos, por ejemplo, en Wang *et al.* (2002) Chem. Coram. 1:1-11; Wang *et al.* (2001) Science 292:498-500; y van Hest *et al.* (2001) Chem. Comm. 19:1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácil ARNt, como se describe, por ejemplo, en Tang *et al.* (2001) J. Am. Chem. 123(44): 1089-11090; y Kiick *et al.* (2001) FEBS Lett. 505(3):465.

En un modo de realización preferente, se han modificado al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 residuos aminoacídicos. Adicional o alternativamente, dichas modificaciones se pueden caracterizar por no tener más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 residuos aminoacídicos modificados. En un modo de realización particularmente preferente, se han modificado al menos 1, pero no más de 10 residuos. Adicional o alternativamente, dichas modificaciones se pueden caracterizar por no tener más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 residuos aminoacídicos modificados. Las modificaciones pueden ser todas sustituciones, todas deleciones, todas adiciones, o cualquier combinación de las sustituciones, deleciones o adiciones.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias aminoacídicas se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias aminoacídicas naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o de sitio dirigido), mutagénesis por restricción y selección, mutagénesis por PCR, y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión de no variante del anticuerpo.

B3. Otras modificaciones

Las variantes polipépticas (y especialmente variantes de anticuerpos) de la presente invención incluyen análogos y derivados que se modifican, por ejemplo, mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión a epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen los que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a escisión química, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Se pueden modificar los anticuerpos y polipéptidos mediante la introducción de uno o más sitios de glucosilación en los anticuerpos, la deleción de uno o más sitios de glucosilación de los anticuerpos o desplazamiento de un sitio de glucosilación existente en los anticuerpos, preferentemente sin alterar la funcionalidad deseada de los anticuerpos, por ejemplo, la actividad de unión. Se pueden introducir sitios de glucosilación en, o someter a deleción de, la región variable y/o constante de los anticuerpos, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir un sitio de glucosilación en un anticuerpo de la invención mediante la modificación o mutación de una secuencia aminoacídica del anticuerpo, de modo que se obtiene la secuencia deseada (por ejemplo, Asn-X-Thr/Ser), y se puede desplazar un sitio de glucosilación modificando la posición 296 en la región Fc, de modo que la posición 296 y no la posición 297 no se glucosila. Los procedimientos de modificación del contenido de hidratos de carbono (glucosilación) de las proteínas son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.ºs 6.472.511 y 6.218.149; la publicación de patente de EE. UU. n.ºs 20030115614 y 20020028486; el documento EP 0359096 B1; y el documento WO 03/035835.

En algunos modos de realización, las moléculas de la invención se generan mediante ingeniería para que comprendan un patrón de glucosilación alterado o una glucoforma alterada. Las glucoformas generadas mediante ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero no limitados a, potenciar la función efectora. Las glucoformas generadas mediante ingeniería se pueden generar mediante cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de cepas de expresión de variantes o generadas mediante ingeniería, mediante la expresión simultánea con una o más enzimas, por ejemplo, N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III), mediante la expresión de un anticuerpo de la invención en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o mediante la modificación de hidrato(s) de carbono después de que el anticuerpo se haya expresado y purificado. Los procedimientos para generar glucoformas generadas mediante ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a 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 EE. UU. n.º 6.602.684; publicación de patente de EE. UU. n.ºs 20030157108, 20030115614 y 20030003097; documentos WO 02/311140; WO 02/30954; WO 01/292246; WO 00/61739; tecnología Potillegent™ disponible de Biowa, Inc. (Princeton, NJ); y la tecnología para la ingeniería de glucosilación GlycoMAb™ disponible de GLYCART biotechnology AG (Zúrich, Suiza).

B4. Conjuguados polipéptidos

Los polipéptidos de la presente invención se pueden fusionar de manera recombinante o conjugar químicamente (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterógenos o porciones de los mismos para generar proteínas de fusión. Preferentemente, el polipéptido de la presente invención (especialmente un anticuerpo) se fusiona con al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido heterógeno para generar una proteína de fusión deseada. La fusión no tiene que ser necesariamente directa, pero se puede producir a través de secuencias enlazadoras. Los polipéptidos de la presente invención también se pueden unir a soportes sólidos o matrices semisólidas, que son particularmente útiles para inmunoanálisis o purificación del antígeno diana. Dichos soportes y matrices incluyen, pero no están limitados a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), microesferas de agarosa, microesferas de acrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Por ejemplo, la unión se puede efectuar mediante procedimientos descritos en *Methods in Enzymology*, 44 (1976).

Los anticuerpos y polipéptidos se pueden conjugar a un agente terapéutico a fin de modificar una respuesta biológica dada, influir en (por ejemplo, incrementar) la semivida sérica del agente terapéutico o dirigir el agente terapéutico a un subconjunto particular de células. También se pueden fusionar a secuencias marcadoras (por ejemplo, un péptido con hexahistidina o una etiqueta "flag") para facilitar la purificación. Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas; véase, por ejemplo, Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2.º ed., Robinson *et al.* (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.).

Las proteínas de fusión adicionales se pueden generar a través de las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominados colectivamente "barajado de ADN"). Se puede emplear el barajado de ADN para alterar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, anticuerpos con afinidades más altas y velocidades de disociación más bajas). Los anticuerpos y polipéptidos de la invención, o sus ácidos nucleicos codificantes, se pueden alterar adicionalmente sometándose a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros procedimientos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención se pueden recombinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterógenas.

B5. Fragmentos

La invención proporciona adicionalmente anticuerpos y otros fragmentos polipeptídicos. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o extremo C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína o anticuerpo natural de longitud completa. Determinados fragmentos pueden carecer de residuos aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada. Estos fragmentos se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos polipeptídicos o de anticuerpo mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por residuos aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislar el fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico o de anticuerpo deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos polipeptídicos o de anticuerpo comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido o anticuerpo natural divulgado en el presente documento.

En algunos modos de realización, un polipéptido de la invención comprende adicionalmente un dominio de dimerización, que puede comprender una secuencia de dimerización, y/o una secuencia que comprende uno o más residuos de cisteína. En algunos modos de realización, el dominio de dimerización se localiza entre un dominio variable de la cadena ligera o cadena pesada del anticuerpo y al menos una porción de una proteína de cubierta

vírica, y uno o más enlaces disulfuro y/o una única secuencia de dimerización puede estar presente en el dominio de dimerización para proporcionar la expresión bivalente. En algunos modos de realización, las cadenas pesadas de un $F(ab)_2$ se dimerizan en un dominio de dimerización que no incluye una región bisagra. El dominio de dimerización puede comprender una secuencia de cremallera de leucinas.

- 5 En otro modo de realización, los fragmentos polipeptídicos de la presente invención comprenden una secuencia aminoacídica de al menos 5 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 10 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 15 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 20 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 25 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 30 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 40 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 50 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 60 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 70 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 80 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 90 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 100 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 125 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 150 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 175 residuos aminoacídicos contiguos, al menos 200 residuos aminoacídicos contiguos o al menos 250 residuos aminoacídicos contiguos de la secuencia aminoacídica de otro polipéptido. En un modo de realización específico, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función del polipéptido.

B6. Diacuerpos y DART

También se proporcionan por la presente invención diacuerpos y reactivos de redirección de afinidad dual ("DART"). Los diacuerpos y DART comprenden dominios de unión a antígeno procedentes generalmente de anticuerpos y polipéptidos de la invención. El diseño y la construcción de diacuerpos y DART se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/019,051, presentada el 4 de enero de 2008, y 60/945,523, presentada el 21 de junio de 2007; la solicitud de patente de EE. UU. 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. (EE. UU.)* 90:6444-6448. Cada cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo comprende un dominio V_L y un dominio V_H , del mismo o de diferentes anticuerpos, que se unen covalentemente de tal manera que los dominios están constreñidos del autoensamblaje. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas produce dos emparejamientos V_L - V_H , formando dos sitios de unión a epítipo, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio V_H ni el V_L está constreñido a ninguna posición en la cadena polipeptídica, ni tampoco están restringidos los dominios en sus posiciones relativas entre sí; la única restricción es que una cadena polipeptídica complementaria esté disponible a fin de formar diacuerpo funcional. Los dominios se pueden separar por un enlazador peptídico y las cadenas polipeptídicas se pueden generar mediante ingeniería para que comprendan al menos un residuo de cisteína en cada cadena, de modo que se pueden formar los enlaces disulfuro intercatenarios para estabilizar el diacuerpo.

Cuando los dominios V_L y V_H proceden del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas, dando como resultado un anticuerpo mono-específico bivalente, o pueden ser diferentes, dando como resultado un anticuerpo biespecífico bivalente (por ejemplo, uno que se une a dos epítopos diferentes en el mismo antígeno). Cuando los dominios V_H V_L proceden de anticuerpos específicos para antígenos diferentes, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. En un modo de realización particular, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como un linfocito B o linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citotóxico natural (NK) o una célula dendrítica.

En diversos modos de realización, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio F_c . Los dominios F_c en las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo dimerizan preferentemente, dando como resultado la formación de una molécula de diacuerpo que muestra propiedades similares a inmunoglobulina, por ejemplo, las interacciones F_c - $F_c\gamma R$. Los diacuerpos que comprenden F_c pueden ser dímeros, por ejemplo, que comprenden dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una un dominio V_H , un dominio V_L y un dominio F_c . En diversos modos de realización, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio bisagra, que puede proceder de cualquier alotipo o isotipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En modos de realización preferentes, el dominio bisagra procede de IgG, en los que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de la misma. El dominio bisagra se puede generar mediante ingeniería en una cadena polipeptídica en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de la cadena, y en determinadas circunstancias se puede generar mediante ingeniería junto con un dominio F_c , de tal manera que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio F_c bisagra.

En otros modos de realización, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios F_c pueden ser tetrámeros, que pueden comprender dos cadenas polipeptídicas "pesadas" (es decir, una cadena polipeptídica que comprende un V_L , un V_H y un dominio F_c), y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras" (es decir, una cadena polipeptídica que comprende un V_L y un V_H). Dichas cadenas más ligeras y más pesadas pueden interactuar para formar un monómero, e interactúan por medio de sus dominios F_c no emparejados para formar una molécula similar a Ig, que puede ser una molécula de DART. Dicho diacuerpo similar a Ig es tetravalente y puede ser mono-específico, biespecífico o tetraespecífico. Las especies de DART similares a Ig tienen propiedades únicas, porque se pueden diseñar sus dominios para que se unan al mismo epítipo (para formar un DART similar a Ig específico monoepítipo tetravalente que se pueda unir a cuatro moléculas de antígeno idénticas) o a epítopos o antígenos diferentes. Por

ejemplo, se pueden diseñar sus dominios para que se unan a dos epítomos del mismo antígeno (para formar un DART similar a Ig específico biepítomo específico monoantígeno tetravalente), o a epítomos de moléculas de antígeno diferentes para formar un DART similar a Ig tetravalente que tenga 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 dichos atributos se pueden producir fácilmente.

Sin pretender vincularse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpo de la invención muestran eficacia terapéutica potenciada con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse inmuno específicamente a una célula diana que expresa un antígeno particular (por ejemplo, FcγR) en niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer en la célula diana más tiempo debido a una avidéz mejorada de la interacción diacuerpo-epítomo. De esta manera, los diacuerpos de la invención tienen utilidad particular en el tratamiento, prevención o regulación de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, en una subpoblación, en la que el antígeno diana se expresa en niveles bajos en la población celular diana.

Debido a su valencia incrementada, las velocidades de disociación bajas y aclaramiento rápido de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, de o por debajo ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la formación de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) *Protein Eng.* 10:1221). De particular importancia es el entrecruzamiento de las células diferentes, por ejemplo, el entrecruzamiento de linfocitos T citotóxicos con respecto a células tumorales (Staerz *et al.* (1985) *Nature* 314:628-31; Holliger *et al.* (1996) *Protein Eng.* 9:299-305). Los dominios de unión a epítomo del diacuerpo también se pueden dirigir a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en los linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, también se descubrió que la unión del diacuerpo a determinantes de células efectoras, por ejemplo, receptores Fcγ (FcγR), activaba la célula efectora (Holliger *et al.* (1996) *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59:2909-2916). Habitualmente, la activación de células efectoras se desencadena mediante la unión de un anticuerpo unido a antígeno con respecto a una célula efectora por medio de la interacción Fc-FcγR; de esta manera, en este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden mostrar funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc. Entrecruzando las células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a la proximidad de las células tumorales, sino que da lugar a la muerte del tumor eficaz. Cao and Lam (2003) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-97.

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención se pueden producir usando una variedad de procedimientos, incluyendo la síntesis de proteínas *de novo* y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas se pueden producir mediante procedimientos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado) o mediante síntesis de ADN en fase sólida. Preferentemente se usan procedimientos de expresión recombinante. En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un V_H y/o 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 variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia aminoacídica de inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

B7. Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de los modos de realización preferentes de la invención se pueden producir u obtener en cualquiera de una variedad de maneras. Por ejemplo, dichos anticuerpos se pueden obtener a partir de plasma, de manera sintética, recombinante o transgénica, por medio de cultivo celular (por ejemplo, hibridoma), etc. La producción de proteínas sintéticas se ha descrito, 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, por ejemplo, en 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 por medio de cultivo celular (por ejemplo, hibridoma) se ha descrito, por ejemplo, en Laffly *et al.* (2006), *supra*; 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 EE. UU. n.º 7.112.439; y publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 20070037216 y 20040197866.

Se pueden producir anticuerpos por medio de procedimientos de expresión en fago, tales como los divulgados, por ejemplo, en 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 patente de EE. UU. n.ºs 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. También se puede usar la tecnología de expresión en fago para incrementar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. La tecnología, denominada maduración de afinidad, emplea mutagénesis o avance de CDR y reelección usando el antígeno afin para identificar los anticuerpos que se unen con afinidad más alta al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial u original. Véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:3903; Wu *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 95:6037; Yelton *et al.* (1995) *J. Immunology* 155:1994; Schier *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:551.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, procedimientos de hibridoma como se describe, por ejemplo, en Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495; Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72 o Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 o procedimientos de ADN recombinante como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 o los anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de expresión en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628 y Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597, por ejemplo. Se pueden usar diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales con respecto a un antígeno de interés. Por ejemplo, se pueden inmunizar diversos animales huésped mediante inyección con un antígeno de interés o derivado del mismo, incluyendo, pero no limitados a, conejos, ovejas, cabras, perros, ratones, ratas y conejillo de Indias, y después de dejar que se produzca una respuesta inmunológica, se pueden identificar los anticuerpos a partir de los sueros de los animales inmunizados.

También se pueden preparar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, a través de la expresión simultánea de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes, seguido de purificación de la molécula deseada usando cromatografía de afinidad, como se describe por Milstein *et al.* (1983) *Nature* 305: 537-39, documento WO 93/08829, Traunecker *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-59. En un enfoque diferente, se fusionan los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina, por ejemplo, a un dominio constante de la cadena pesada, que comprende al menos parte de las regiones C_{H2}, C_{H3} y bisagra. Se pueden insertar los ácidos nucleicos que codifican estas fusiones en los mismos o diferentes vectores de expresión, y se expresan en un organismo huésped adecuado.

Se pueden producir anticuerpos totalmente humanos (también denominados anticuerpos completamente humanos) usando ratones transgénicos que no puedan expresar genes endógenos de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas, pero que puedan expresar genes humanos de la cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los transgenes de inmunoglobulina humanos albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Se describe una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, por ejemplo, en Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, y la patente de EE. UU. n.º 5.633.425. También se pueden producir anticuerpos totalmente humanos usando otras técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de expresión en fago, como se describe por Hoogenboom y Winter (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381 y Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581. También se pueden obtener comercialmente anticuerpos totalmente humanos de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y Genpharm (San José, Calif.). Se pueden generar anticuerpos totalmente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo, como se describe, por ejemplo, por Jaspers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899-903.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, incluyendo los polipéptidos y anticuerpos. También se describen vectores que comprenden los polinucleótidos y células huésped que comprenden los vectores. Se pueden obtener los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, y se puede determinar la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos, mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. En un modo de realización, se pueden cribar las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica, mediante técnicas estándar conocidas en la técnica para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

B8. Caracterización de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar en una variedad de maneras. En particular, los anticuerpos de la invención se pueden someter a ensayo para determinar la capacidad de unirse

inmunoespecíficamente a un antígeno, por ejemplo, HER2/neu, o, si la molécula comprende un dominio Fc (o porción del mismo), para determinar la capacidad de mostrar interacciones Fc-FcγR, es decir, unión específica de un dominio de Fc (o porción del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo se puede realizar en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-421), en microesferas (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), en perlas (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), en bacterias (patente de EE. UU. n.º 5.223.409), en esporas (patente de EE. UU. n.ºs 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 89:1865-1869) o en fago (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 87:6378-6382; y Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310). Las moléculas que se han identificado para unirse inmunoespecíficamente a un antígeno entonces se pueden someter a ensayo para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Los inmunoanálisis que se pueden usar para analizar la unión inmunoespecífica, reactividad cruzada e interacciones Fc-FcγR incluyen, pero no están limitados a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas, tales como inmunoelctrotransferencia, radioinmunoanálisis, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoanálisis de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos inmunocromatográficos, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, ensayos de inmunofluorescencia e inmunoanálisis de proteína A, etc. (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*).

La afinidad de unión por un antígeno diana se mide o determina típicamente mediante ensayos de anticuerpo-antígeno estándar, tales como ensayos competitivos Biacore, ensayos de saturación o inmunoanálisis, tales como ELISA o RIA.

Preferentemente, se usa la separación celular activada por fluorescencia (FACS), que usa cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, para ensayos basados en mecanismos inmunológicos o funcionales para caracterizar las moléculas de la invención. Los separadores de flujo pueden examinar rápidamente un gran número de células individuales que han sido unidas, por ejemplo, opsonizadas, por moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora). Adicionalmente, los parámetros específicos usados para la optimización del comportamiento del anticuerpo, incluyen, pero no están limitados a, concentración de antígeno, tiempo de competencia cinética o restricción de FACS, cada uno de los cuales se puede variar a fin de seleccionar las moléculas de anticuerpo que muestran propiedades de unión específica. Los citómetros de flujo para separar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.ºs 4.347.935; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS Vantage™ en venta por Becton Dickinson and Company y el sistema COPAS™ en venta por Union Biometrica.

Se pueden usar ensayos basados en resonancia de plasmón superficial para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión a antígeno o unión Fc-FcγR. Se puede usar cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, la tecnología descrita, por ejemplo, en 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 la patente EE. UU. n.ºs 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; y 6.268.125. Los datos se usan para representar las curvas de unión y determinar las constantes de velocidad, por ejemplo, K_{on} , K_{off} y la constante de unión en el equilibrio aparente K_a , por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en Myszka (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 modos de realización preferentes, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis por RPS se pueden usar como una medida predictiva de cómo una molécula funciona en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC.

Se puede realizar la caracterización de la unión a FcγR mediante moléculas que comprenden un dominio Fc (o porción del mismo) y/o que comprenden dominio de unión a epítopo específico para un FcγR de acuerdo con los procedimientos descritos en la técnica de tecnologías para la ingeniería de anticuerpos. Son bien conocidos los ensayos para determinar las funciones de células efectoras, 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, se pueden realizar ensayos para determinar la fagocitosis mediada por FcγR usando monocitos humanos, midiendo la capacidad de las células THP-1 de fagocitar eritrocitos de carnero (SRBC) opsonizados por IgG fluoresceinados mediante procedimientos descritos previamente en Tridandapani *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:20480-20487, o usando un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) como se describe por Bedzyk *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264(3):1565-1569. Se pueden usar procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica usados para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (o porciones de los mismos). Por ejemplo, para determinar la unión de C1q, se puede realizar un ELISA de unión de C1q, y para evaluar

la activación del complemento se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163.

En otro modo de realización, se pueden someter a ensayo las moléculas de la invención para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en las células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica y descritos, por ejemplo, en 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 un modo de realización preferente específico, se usa un ensayo fluorimétrico en tiempo retardado para medir la actividad ADCC frente a células diana marcadas de manera fluorescente, como se describe, por ejemplo, en Blomberg *et al.* (1996) *Journal of Immunological Methods* 193:199-206. Las células diana usadas en los ensayos de ADCC de la invención incluyen, pero no están limitadas a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de acceso ATCC HTB-30 (Trempe *et al.* (1976) *Cancer Res.* 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de acceso ATCC CCL-86 (Epstein *et al.* (1965) *J. Natl. Cancer Inst.* 34:231-240), y células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (Klein *et al.* (1968) *Cancer Res.* 28:1300-1310). Las células diana se deben reconocer por el sitio de unión a antígeno de la molécula que se va a ensayar. Preferentemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC de la invención son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferentemente a partir de sangre humana normal usando procedimientos estándar conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Paque.

C. Tratamiento y composiciones farmacéuticas

La administración de las composiciones (por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos) de la presente invención puede ser por un propósito "profiláctico" o "terapéutico", o alternativamente se puede usar para propósitos de diagnóstico. Se afirma que las composiciones de la presente invención se administran por un propósito "terapéutico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar un tratamiento para una manifestación real de la enfermedad. Cuando se proporciona terapéuticamente, el compuesto se proporciona preferentemente al identificar (o poco después) un síntoma de la enfermedad real. La administración terapéutica del compuesto sirve para atenuar la gravedad de dicha enfermedad o invertir su evolución. Se afirma que las composiciones de la presente invención se administran por un propósito "profiláctico" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa para proporcionar un tratamiento para una afección o enfermedad potencial. Cuando se proporciona profilácticamente, el compuesto se proporciona preferentemente con antelación a cualquier síntoma de la misma. La administración profiláctica del compuesto sirve para prevenir o atenuar cualquier avance o recurrencia posterior de la enfermedad.

Proporcionar un tratamiento o "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como moderación, remisión, disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el paciente, reducir la velocidad de degeneración o empeoramiento, haciendo que el punto final de la degeneración sea menos debilitante, o mejorar el bienestar físico o mental de un paciente. El tratamiento o mejora de los síntomas se puede basar en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de una exploración física, exámenes neuropsiquiátricos y/o una evaluación psiquiátrica.

Los sujetos preferentes para el tratamiento incluyen animales, más preferentemente especies de mamíferos, tales como seres humanos u otros primates, y animales domésticos, tales como perros, gatos y similares, sujetos a la enfermedad y otras afecciones patológicas. Un "paciente" se refiere a un sujeto, preferentemente mamífero (incluyendo ser humano).

Determinados modos de realización de la presente invención se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes terapéuticos, y a administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos, que puedan tratar profiláctica y/o terapéuticamente trastornos. El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que tiene un efecto terapéutico para tratar profilácticamente o terapéuticamente un trastorno. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención, así como otros agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con, o conjugados a, un anticuerpo o polipéptido. En un modo de realización preferente, 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 FcγR (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa). Por ejemplo, las moléculas de la invención se pueden unir a un antígeno de superficie celular y un FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, linfocito NK), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) frente a dicha célula. En algunos modos de realización, los anticuerpos y polipéptidos de la invención son especialmente adecuados para el tratamiento de cánceres. La eficacia del tratamiento con anticuerpos monoclonales estándar depende del polimorfismo de FcγR 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 y median la ADCC. Los alelos de alta afinidad mejoran la capacidad de las células efectoras de mediar la ADCC. Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden comprender un dominio Fc de variante que muestra afinidad potenciada por

FcγR (con respecto a un dominio Fc natural) en células efectoras, proporcionando de esta manera mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes con independencia de su polimorfismo de FcγR.

Para propósitos de diagnóstico, los anticuerpos o polipéptidos se pueden acoplar a una sustancia detectable, de modo que se pueden usar, por ejemplo, para controlar el desarrollo o evolución de una enfermedad, trastorno o infección. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, 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 radioactivos (por ejemplo, carbono 14, manganeso 54, estroncio 85 o cinc 65), metales emisores de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente a las moléculas de la invención o bien indirectamente a través de un intermedio (por ejemplo, un enlazador) usando técnicas conocidas en la técnica.

C1. Trastornos tratables

Los trastornos ejemplares que se pueden tratar mediante diversos modos de realización de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, trastornos proliferativos, trastornos proliferativos celulares, y cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. En diversos modos de realización, la invención engloba procedimientos y composiciones para el tratamiento, prevención o regulación de una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas (anticuerpos o polipéptidos) que se unen a un antígeno de la enfermedad. Por ejemplo, las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, inhibición, reducción del crecimiento o remisión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Sin pretender vincularse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de la invención median la función efectora, dando como resultado la remisión del tumor, la reducción del tumor o una combinación de las mismas. En modos de realización alternativos, los diauerpos de la invención median la actividad terapéutica mediante el entrecruzamiento de receptores y/o antígenos de superficie celular y apoptosis potenciada o señalización reguladora del crecimiento negativo.

Los anticuerpos con una afinidad disminuida por FcγRIIB y una afinidad incrementada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden dar lugar a una respuesta de activación potenciada tras la unión a FcγR y, de esta manera, tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir el cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres tratables mediante los procedimientos en el presente documento incluyen el linfoma mieloide agudo, carcinoma suprarrenal, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, sarcoma de tejido conjuntivo y huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de bronquios, cáncer cervical, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de vesícula biliar, cáncer gastrointestinal, glioma, tricoleucemia, hepatocarcinoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer del conductillo biliar intrahepático, cáncer articular, 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 de oído medio, mieloma múltiple, mieloma, mixosarcoma, cáncer de fosas nasales, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, carcinoma amicrocítico de pulmón, cáncer de nariz, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, cáncer de hipófisis, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer renal, cáncer de la glándula salival, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma epidermoide, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer urinario, cáncer uterino, cáncer vaginal, cáncer vesicular, cáncer de vulva, y tumor de Wilms.

En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer hematopoyético o cáncer relacionado con la sangre, tal como linfoma, leucemia, mieloma, neoplasia maligna linfoide, cáncer del bazo y cáncer de los ganglios linfáticos. En un modo de realización preferente, el cáncer es un cáncer asociado a linfocitos B, tal como, por ejemplo, linfoma de grado bajo, intermedio o alto (incluyendo 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 la zona marginal, linfoma de linfocitos B del tejido linfático asociado a mucosa, linfoma no hodgkiniano, linfoma linfocítico de células pequeñas y linfomas de linfocitos T) y leucemias (incluyendo leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de linfocitos B (CD5 + linfocitos B), leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica aguda, mielodisplasia, leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda y leucemia secundaria), mieloma múltiple, tal como neoplasia maligna de células plasmáticas, y otros cánceres asociados a linfocitos B o linfocitos T y/o hemáticos. Otros cánceres ejemplares son cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y linfocitos citolíticos naturales.

En algunos modos de realización, el cáncer que se va a tratar es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma suprarrenal o carcinoma amicrocítico de pulmón. En algunos modos de realización, el cáncer es cáncer de mama o cáncer de próstata. En algunos modos de realización, el cáncer es un cáncer en el que se sobreexpresa HER2/neu. En un modo de realización específico, un anticuerpo o polipéptido de la invención inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un

70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 %, o al menos un 10 % con respecto al crecimiento de células cancerosas en ausencia del anticuerpo o polipéptido de la invención.

5 Los anticuerpos con una afinidad incrementada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden dar lugar a una respuesta de activación reducida tras la unión a FcγR y, de esta manera, tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir la inflamación y enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias o afecciones relacionadas con mecanismos autoinmunitarios que se pueden tratar de acuerdo con la divulgación en el presente documento incluyen, pero no están limitadas a, afecciones alérgicas, encefalomiелitis alérgica, neuritis alérgica, rinitis alérgica, alopecia areata, ELA, anemia, incluyendo anemia aplásica, anemia de Coombs positiva, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHA), anemia perniciosa, y eritroblastopenia (APCR), espondiloartritis anquilosante, enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos antimembrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis juvenil, artrosis, artropatía soriásica), asma, aterosclerosis, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluyendo ooforitis y orquitis autoinmunitaria, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves-Basedow, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatías poliglandulares), diabetes de tipo I también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutrocitopenia autoinmunitaria, poliendocrinopatías autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), bronquiolitis obliterante (no de trasplante), miocardiopatía incluyendo arteriopatía coronaria, síndrome de Castleman, celiaquía (enfermedad celíaca), urticaria autoinmunitaria crónica, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad por crioaglutininas, colitis, afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, crioglobulinemia, lupus eritematoso cutáneo, dermatitis incluyendo dermatitis atópica, enfermedades que implican diápedesis leucocitaria, eccema, encefalitis, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia del factor VIII, fibromialgia, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad injerto contra huésped (EICH), granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y granulocitopenia, síndrome de Guillain-Barré, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, neuropatía por IgA y neuropatía mediada por IgM, nefritis por inmunocomplejos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, diabetes de tipo 1, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, deficiencia de adhesión leucocitaria, leucocitopenia, liquen plano, lupus (incluyendo nefritis, no renal, discoide, alopecia), neumonía intersticial linfocítica (VIH), enfermedad de Ménière, meningitis, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome de lesión multiorgánica, esclerosis múltiple, miastenia grave, neumonía intersticial no específica (NINE), pancitopenia, penfigoide (por ejemplo, penfigoide ampuloso y penfigoide cicatrizal), pénfigo (por ejemplo, vulgar, foliáceo y pénfigo paraneoplásico), policondritis, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, hipotiroidismo primario, soriasis, glomerulonefritis rápidamente progresiva, enfermedad de Reiter, síndrome de dificultad respiratoria incluyendo síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), respuestas asociadas con enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), fenómeno de Reynaud, sarcoidosis, síndrome de Sjögren, rechazo de trasplantes de vísceras macizas (incluyendo el pretratamiento para valores de anticuerpos reactivos de perfil alto, depósito de IgA en tejidos, etc.), síndrome de Stevens-Johnson, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso disseminado (LED), esclerodermia incluyendo la esclerodermia sistémica, síndrome de CREST y esclerosis, púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), necrólisis epidérmica tóxica, tuberculosis, uveítis, vasculitis, tal como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vasculitis asociada a ANCA (VAA), vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, y la arteritis de Takayasu), vasculitis de vasos medios (incluyendo enfermedad de Kawasaki, granulomatosis de Wegener y panarteritis nudosa) y vasculitis de vasos pequeños (incluyendo arteritis de Churg-Strauss, poliarteritis/poliarteritis microscópica, hipersensibilidad/vasculitis alérgica, púrpura de Schoenlein Henoch y vasculitis crioglobulinémica esencial) y vitiligo. En un modo de realización preferente, el trastorno autoinmunitario está seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, soriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso disseminado, diabetes de tipo 1 y vasculitis.

55 Los ejemplos no limitantes de trastornos inflamatorios tratables en el presente documento incluyen trastornos inflamatorios mediados por mecanismos inmunitarios (IMID), que son afecciones inflamatorias provocadas y mantenidas por una respuesta inmunitaria patológica específica de antígeno. Entre estos trastornos se encuentran diversos tipos de enfermedades alérgicas, tales como asma, alergia al polen y urticaria, artritis, tal como artrosis y artritis reumatoide, inflamación crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos del tejido conjuntivo, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto y enfermedad injerto contra huésped, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), osteólisis inflamatoria, diabetes insulino dependiente, fibrosis pulmonar, retinitis, artropatía indiferenciada, espondiloartropatía indiferenciada y uveítis. También se pueden usar las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc de variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA para prevenir el rechazo de trasplantes. En un modo de realización preferente, el

IMID está seleccionado del grupo que consiste en asma, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped y enfermedad intestinal inflamatoria.

Los polipéptidos antiinflamatorios de la presente invención reducen preferentemente la inflamación en un animal en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal que no recibe dichos polipéptidos.

En determinados modos de realización, los polipéptidos de la invención son tóxicos para un agente infeccioso, potencian la respuesta inmunitaria frente a dicho agente o potencian la función efectora frente a dicho agente, con respecto a la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar o prevenir mediante las moléculas de la invención están provocadas por agentes infecciosos incluyendo, pero no limitados a bacterias, hongos, protozoos y virus. Las enfermedades bacterianas ejemplares no limitantes incluyen las provocadas por *Bacillus anthracis* (carbunco), *Borrelia burgdorferi* (borreliosis de Lyme), *Candida*, *Chlamydia*, *Colera*, *Difteria*, *E. coli*, *Enterococcus faecialis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pertussis*, *Peste*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Salmonella*, *Estafilococo*, *Streptococo* y *Tétanos*. Las enfermedades por protozoos no limitantes incluyen las provocadas por *Coccidia*, *Leishmania*, *Paludismo* o *Tripanosoma*.

Los ejemplos no limitantes de enfermedades víricas incluyen las provocadas por adenovirus, arbovirus, coronavirus, virus de Coxsackie, citomegalovirus, ébola, equinovirus, virus ECHO, endotoxina (LPS), enterovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, hepatitis murina), virus del herpes (por ejemplo, herpes simple de tipo I (VHS-I), herpes simple de tipo II (VHS-II), virus del herpes gamma murino), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II), hantavirus, gripe, virus de la leucemia (por ejemplo, leucemia murina, leucemia felina, etc.); virus del sarampión, virus de las paperas, papilomavirus, papovavirus, virus de la poliomielitis, virus respiratorio sincicial, retrovirus, rinovirus, peste bovina, rotavirus, virus de la rubéola, viruela, virus linfotrópico de linfocitos T 1, vaccinia, varicela, y agentes de enfermedades víricas, tales como meningitis vírica, encefalitis o dengue.

C2. Formulaciones

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, y pueden incluir un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden encontrar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta un 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles, etc. Dichas composiciones se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, mezclando el ingrediente activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

Los ingredientes activos también se pueden formular para que proporcionen una liberación rápida, mantenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden modificar u optimizar las características físicas y químicas de las composiciones de la invención de acuerdo con el experto en la técnica, dependiendo del modo de administración y la enfermedad o trastorno particular que se va a tratar. Las composiciones se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria, un recipiente sellado, o como parte de un kit, que puede incluir instrucciones para su uso y/o una pluralidad de formas de dosificación unitarias.

En modos de realización particulares, se pueden incorporar los agentes terapéuticos en una composición, por, por ejemplo, mediante encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes que puedan expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu and Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovírico u otro vector, etc. En otro modo de realización particular, los agentes terapéuticos se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y se pueden reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina hasta la concentración apropiada para su administración a un sujeto.

Preferentemente, el agente terapéutico se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. El polvo liofilizado se debe almacenar entre 2 y 8 °C en su recipiente original y las moléculas se deben administrar por vía parenteral en el plazo de 12 horas, preferentemente en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas o en el plazo de 1 hora tras haberse reconstituido. En un modo de realización alternativo, los agentes terapéuticos se suministran en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente indicando la cantidad y concentración del agente terapéutico. Preferentemente, la forma líquida se suministra en un recipiente sellado herméticamente en al menos 1 mg/ml, más preferentemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg,

al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

C3. Kits

5 Las composiciones también pueden estar incluidas en un kit. En aspectos no limitantes, el kit puede incluir una composición farmacéutica que comprenda un agente terapéutico, instrucciones para su administración y/u otros componentes. En modos de realización preferentes, el kit puede incluir una composición lista para su administración. Los recipientes de los kits pueden incluir un frasco, dosificador, envase, compartimento u otros tipos de recipientes en los que se pueda colocar un componente. El recipiente puede incluir indicaciones en su superficie. Por ejemplo, las indicaciones pueden ser una palabra, una frase, una abreviatura, una imagen o un símbolo. Los recipientes pueden 10 dosificar una cantidad predeterminada del componente (por ejemplo, las composiciones de la presente invención). La composición se puede dosificar en un pulverizador, un aerosol, o en una forma líquida o forma semisólida. Los recipientes pueden tener mecanismos de pulverización, bombeo o compresión. En determinados aspectos, el kit puede incluir una jeringuilla para administrar las composiciones de la presente invención.

15 Cuando hay más de un componente en el kit (se pueden envasar conjuntamente), el kit también contiene generalmente un segundo, tercero u otros recipientes adicionales en los que se pueden colocar por separado componentes adicionales. Los kits de la presente invención también pueden incluir un recipiente que aloje los componentes en un espacio cerrado para su venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que se guardan los frascos, dosificadores o envases deseados. Un kit también puede incluir instrucciones para emplear los componentes del kit, así como el uso de cualquier otra 20 composición, compuesto, agente, ingrediente activo u objeto no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir una explicación de cómo aplicar, usar y conservar los productos o composiciones.

C4. Administración y dosificación

25 Están disponibles una variedad de vías de administración para las composiciones de la presente invención. Por supuesto, el modo particular seleccionado depende del agente terapéutico particular seleccionado, si la administración es para la prevención, diagnóstico o tratamiento de la enfermedad, la gravedad del trastorno médico que se está tratando y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los polipéptidos de la presente invención se pueden administrar usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable y produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen, pero no están limitados a, oral, bucal, sublingual, por inhalación, mucosa, 30 rectal, intranasal, tópico, ocular, periocular, intraocular, transdérmico, subcutáneo, intrarterial, intravenoso, intramuscular, parenteral o metodologías de infusión. En un modo de realización específico, puede ser deseable administrar localmente las composiciones farmacéuticas de la invención en el área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluya membranas, 35 tales como membranas sialásticas o fibras.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio 40 provechoso para el paciente, es decir, curación o mejora de las afecciones crónicas, una reducción de los síntomas, un incremento de la velocidad de curación de dichas afecciones, o un cambio detectable en los niveles de una sustancia en el tejido tratado o circundante. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, bien si se administran en combinación, en serie o simultáneamente.

45 La pauta posológica y las cantidades eficaces para usos terapéuticos y profilácticos, es decir, el "régimen de dosificación", depende de una variedad de factores, incluyendo la etapa de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, edad y similares. La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación. Por ejemplo, existen 50 numerosos procedimientos de determinación de la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 por ciento de la población) y la DL_{50} (la dosis letal del 50 por ciento de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción DE_{50}/DL_{50} . Son preferentes las composiciones que muestran índices terapéuticos altos. Se pueden usar los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celular o estudios con animales en la formulación de un intervalo de dosificaciones para uso humano. La dosificación está preferentemente en un intervalo de concentraciones que incluye la DE_{50} con poca o ninguna 55 toxicidad, y puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

El régimen de dosificación también tiene en cuenta los parámetros de farmacocinética bien conocidos en la técnica, es decir, la velocidad de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, aclaramiento 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, arriba). El estado de la técnica permite que el médico determine el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente terapéutico y enfermedad o afección tratada. Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones de la presente invención se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia según se requiera y tolere por el paciente. La duración del tratamiento profiláctico y terapéutico varía dependiendo de la enfermedad o afección particular que se está tratando. Algunas enfermedades se prestan a un tratamiento agudo, mientras que otras requieren un tratamiento a largo plazo. Si la administración no es diariamente, por ejemplo, si las inyecciones se dan cada pocos días, cada pocas semanas, o cada pocos meses, entonces, se puede incluir más agente terapéutico en cada administración, de modo que la liberación diaria del agente es adecuada para satisfacer las necesidades terapéuticas.

En un modo de realización preferente, los agentes terapéuticos de la invención se administran en regímenes de dosificación metronómicos, mediante infusión continua o bien administración frecuente sin periodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación en intervalos constantes sin periodos de descanso. Típicamente los agentes terapéuticos, en particular, los agentes citotóxicos, se usan en dosis más bajas. Dichos regímenes de dosificación engloban la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante periodos prolongados de tiempo, lo que puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los periodos de descanso. Kamat *et al.* (2007) Cancer Research 67:281-88. En determinados modos de realización, los agentes terapéuticos se administran mediante una dosis baja crónica o infusión continua que varía desde 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 pauta de dichos regímenes de dosis se puede optimizar por el oncólogo experto.

Para los anticuerpos englobados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un 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. Se pueden reducir o alterar la dosificación y frecuencia de administración potenciando la absorción y penetración en tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones, tales como, por ejemplo, lipidación. En un modo de realización, la dosificación de los anticuerpos administrados a un paciente es de 0,01 mg a 1000 mg/día, cuando se usan como tratamiento de agente único. En otro modo de realización, los anticuerpos se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es más baja que cuando dichas moléculas se usan como un tratamiento de agente único. En un ejemplo preferente, se trata un sujeto con anticuerpos en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas.

40 **C5. Tratamientos de combinación**

Los anticuerpos o polipéptidos de la invención se pueden administrar en combinación con otros tratamientos conocidos para los expertos en la técnica para el tratamiento o prevención del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, o enfermedad infecciosa, incluyendo, pero no limitados a, quimioterapias experimentales y estándar actuales, tratamientos hormonales, tratamientos biológicos, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. Los anticuerpos o polipéptidos de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos conocidos para los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad infecciosa o intoxicación.

Como se usa en el presente documento, 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 tampoco significa que los agentes se administren exactamente en el mismo momento, sino más bien significa que un anticuerpo o polipéptido de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y en un intervalo de tiempo, de tal manera que el anticuerpo o polipéptido de la invención pueden actuar conjuntamente con el otro agente para proporcionar un beneficio incrementado que si se hubieran administrado de otro modo. Por ejemplo, cada agente terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, tratamiento hormonal o tratamiento biológica) se puede administrar en el mismo momento o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran en el mismo momento, se debe administrar suficientemente próximos en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico se puede administrar por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, uno por vía oral y uno por vía parenteral.

Un primer agente terapéutico se puede administrar 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), de manera concomitante con, o posterior a (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) la administración de un segundo (o posterior) agente terapéutico a un sujeto con un trastorno. En modos de realización preferentes, se administran dos o más agentes en 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.

Los agentes terapéuticos se pueden administrar de manera cíclica a un sujeto. El tratamiento en ciclos implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o tercer agente durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial. El tratamiento en ciclos puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más de los tratamientos, evitar o reducir los efectos secundarios de uno de los tratamientos, y/o mejora la eficacia del tratamiento. Los ciclos ejemplares son de aproximadamente una vez cada semana, aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas, y aproximadamente una vez cada tres semanas. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es desde aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más típicamente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos y más típicamente desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

Para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se conjuga con, o se administran en combinación con, otro agente terapéutico, tal como, pero no limitado a, un agente alquilante (por ejemplo, mecloretamina o cisplatino), inhibidor de la angiogénesis, antraciclina (por ejemplo, daunorubicina/daunomicina o doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomomicina, bleomicina, o antramicina), anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF, tal como bevacizumab (en venta como AVASTIN® por Genentech, Inc.), un anticuerpo anti-EGFR, tal como panitumumab (en venta como VECTIBIX™ Amgen, Inc.), o un anticuerpo anti-integrina, tal como natalizumab (en venta como TYSABRI® por Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc.)), un antimetabolito (por ejemplo, metotrexato o 5-fluorouracilo), un agente antimetabólico (por ejemplo, vincristina o paclitaxel), una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente de hormonoterapia (por ejemplo, un modulador selectivo del receptor estrogénico (por ejemplo, tamoxifeno o raloxifeno), inhibidor de la aromatasa, análogo de luliberina, gestágeno, adrenocorticosteroide, estrógeno, andrógeno, agente antiestrógenos, agente bloqueante del receptor androgénico, inhibidor de la 5-alfa-reductasa, inhibidor de la producción suprarrenal, etc.), un inhibidor de la metaloproteasa de matriz, un elemento radioactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.) o cualquier otro agente quimioterápico.

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

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adicionales para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluyen anticuerpos para 17-1A, $\alpha\text{v}\beta_3$, AFP, CD3, CD18, CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CTLA-4, proteínas asociadas a ADN, receptores de EGF, Ep-CAM, gangliósido GD2, gp IIIb/IIIa, gp72, HER2, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, IgE, gangliósido GD3, MUC-1, nuC242, antígeno de PEM, antígeno SK-1, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, VEGF y receptor de VEGF.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se pueden administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, tal como, pero no limitado a, anticuerpos, agentes anticolinérgicos, agonistas beta, metilxantinas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, celecoxib o diclofenaco), y fármacos antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo, glucocorticoides, dexametasona, cortisonas, prednisona o icosanoides). Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de enfermedad inflamatoria, tal como, pero no limitados a anticuerpos para integrina alfa4beta7, beta2, CBL, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD11/18, CD14, CD18, CD23, CD25, CD40L, CD64 (FcR), CD80, CD147, complemento (C5), selectina E, Fact VII, gpIIb/IIIa, ICAM-3, IgE, IL-4, IL-5, IL-8, TNF-alfa y VLA-4.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, tal como, pero no limitado a, anticuerpos, brequinar, ciclofosfamida, ciclosporina A, moduladores del receptor de citocinas, desoxiespergualina, leflunomida, antibióticos macrólidos, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), metotrexato, metilprednisolona, mizoribina, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), esteroides y moduladores del receptor de linfocitos T. Los anticuerpos adicionales pueden ser cualquier anticuerpo adecuado para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, y los ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos para receptor de integrinas $\alpha 4\beta 7$, antígeno CBL, CD2, CD4, CD23, CD40, CD80, FcRI, interferon gamma, IL-8, inosina monofosfato deshidrogenasa, ICE interleucina 1 beta, P38MAP cinasa y TNF.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, tal como, pero no limitado a, un agente antivírico, antifúngico o antibiótico. Los antibióticos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprima), aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, neomicina o espectinomicina), anfenicoles (por ejemplo, cloranfenicol), anfomicinas, ansamicinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), bacitracinas, carbacefemos (por ejemplo, loracarbef), carbapenemas (por ejemplo, biapenem e imipenem), 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), monobactamas (por ejemplo, carumonam), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, y cloruro de furazolium), oxacefemos (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas, quinolonas (por ejemplo, ofloxacina o ciprofloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, bencilsulfamida y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona de sodio, y solasulfona) y tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina y clortetraciclina).

Los agentes antifúngicos que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, anfotericina B, butoconazol, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, haloprogrina, intratecal, itraconazol, ketoconazol, miconazol, naftifina, nistatina, terbinafina, terconazol, tioconazol y undecilenato. Los agentes antivíricos útiles que se pueden usar en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero no están limitados a, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, análogos de nucleósidos, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa e inhibidores de proteasa. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes son aciclovir, adefovir, interferones alfa, amantadina, amprenavir, clevadine, entecavir, foscarnet, ganciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina y zidovudina.

C6. Demostración de la utilidad terapéutica

Las composiciones farmacéuticas, agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se someten a prueba preferentemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un modelo de organismo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para la determinar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que se pueden usar para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica incluyen ensayos de cultivo celular en los que se cultiva una muestra de tejido del paciente 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 dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido se puede obtener mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la(s) molécula(s) profiláctica(s) o terapéutica(s) terapéuticamente más eficaz/eficaces para cada paciente individual. En diversos modos de realización específicos, se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicadas en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T) para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado sobre dichos tipos celulares.

Los sistemas de modelos animales adecuados incluyen, pero no están limitados a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede usar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. En un modo de realización específico de la invención, las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos se someten a prueba en un sistema de modelo murino. Los modelos animales preferentes para su uso en los procedimientos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan Fc γ R humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, se puede usar cualquier modelo murino descrito en el documento US 5.877.396 en la presente invención.

La actividad antiinflamatoria se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. and Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty *et al.* (eds.), capítulo 30 (Lee and Febiger, 1993). Por ejemplo, los modelos de artritis inducida por adyuvante, tales como artritis inducida por colágeno, ximosano o carragenina en ratas, hámsters, conejos, perros y cerdos, son útiles en el estudio de la actividad antiinflamatoria, y la inhibición del edema plantar inducido por carragenina en ratas es un cribado primario *in vivo* para determinar la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictiva de la eficacia en seres humanos. Por ejemplo, estos modelos se describen en Winter *et al.* (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111:544-47; and Hansra *et al.* (2000) *Inflammation* 24(2):141-155. También se pueden usar modelos animales para la enfermedad intestinal inflamatoria para evaluar la eficacia de los tratamientos de la invención, por ejemplo,

los modelos descritos, por ejemplo, en Strober (1985) Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S; Kim *et al.* (1992) Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537). En estos modelos, se pueden inducir la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en animales mediante administración oral de polisacáridos sulfatados, sulfato de dextrano o irritantes químicos.

5 La eficacia en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios se puede evaluar usando modelos animales para trastornos autoinmunitarios, tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad tiroidea, lupus eritematoso diseminado y glomerulonefritis, por ejemplo, los modelos descritos en Flanders *et al.* (1999) Autoimmunity 29:235-246; Krogh *et al.* (1999) Biochimie 81:511-515; Foster (1999) Semin. Nephrol. 19:12-24, etc.

10 La actividad antineoplásica de los agentes terapéuticos también se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tales como el modelo murino IDCG, ratones transgénicos o ratones atímicos con xenoinjertos humanos, y otros modelos animales, tales como hámsters, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig and Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher). Los modelos animales preferentes son modelos de xenoinjerto en ratones. Las líneas celulares tumorales que se pueden usar como una fuente para los tumores de xenoinjerto incluyen, pero no están limitadas a, células SKBR3 y MCF7, que pueden proceder de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen tanto receptores de prolactina como de erbB2. Las células SKBR3 se han usado de manera rutinaria en la técnica como modelos tumorales de xenoinjerto y ADCC. Alternativamente, se pueden usar células OVCAR3 procedentes de un adenocarcinoma de ovario humano como una fuente para tumores de xenoinjerto.

20 Los agentes terapéuticos de la invención se someten a prueba preferentemente *in vitro*, y entonces *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Se pueden cribar los agentes terapéuticos y procedimientos usando células de un tumor o una línea celular maligna. Se pueden usar muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, se puede someter a ensayo la proliferación celular midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul de tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en cambios en la morfología, crecimiento disminuido y/o formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en la membrana basal tridimensional o preparación de la matriz extracelular, etc.

30 Se pueden usar los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes terapéuticos para uso en seres humanos. La dosificación de dichos agentes se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el procedimiento de invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones de plasma en circulación que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logre una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

D. Otros procedimientos

D1. Tratamiento génico

45 Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican las moléculas de la invención se pueden administrar para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, a modo de tratamiento génico. El tratamiento génico se refiere al tratamiento realizado mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En este modo de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína de fusión o anticuerpo codificado que media un efecto terapéutico o profiláctico. Se puede usar cualquier procedimiento para el tratamiento génico disponible en la técnica, por ejemplo, los procedimientos descritos, por ejemplo, en Goldspiel *et al.* (1993) Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and 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.

55 En un aspecto preferente, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, diacuerpo o proteína de fusión de la invención, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterógenos, ligados de manera funcional a la región codificante de anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otro modo de realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de esta manera la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos codifican

anticuerpos, como se describe en Koller and Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 86:8932-35; y Zijlstra *et al.* (1989) Nature 342:435-438.

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

10 Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se puede administrar *in vivo*, donde se expresa para producir el polipéptido codificado. Esto se puede efectuar mediante cualquiera de numerosos procedimientos, tales como mediante infección usando retrovíricos u otros vectores víricos (como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.980.286; Miller *et al.* (1993) Meth. Enzymol. 217:581-599; Salmons and Gunzberg (1993) Human Gene Therapy 4:129-141; Grossman and Wilson (1993) Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114; Kozarsky and 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 EE. UU. n.º 5.436.146), mediante inyección directa de ADN desnudo, mediante el uso del bombardeo de micropartículas (por ejemplo, un cañón de genes), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o mediante su administración ligados a un péptido que se sabe que penetra en el núcleo o ligados a un antígeno sujeto a endocitosis mediada por receptor (como se describe, por ejemplo, en Wu and 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 se puede usar para dirigir tipos celulares que expresan específicamente los receptores).

20 Se puede introducir 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 and Scott (1986) Mayo Clinic Proc. 61:771; Stemple and Anderson (1992) Cell 7 1:973-985. Las células recombinantes resultantes se pueden administrar a un sujeto mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Los glóbulos sanguíneos recombinantes (por ejemplo, células progenitoras o madre hematopoyéticas) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células concebidas para su uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y se puede determinar por un experto en la técnica. Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico con propósitos de tratamiento génico engloban cualquier tipo celular deseado disponible e incluyen, pero no están limitadas a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, hepatocitos; glóbulos sanguíneos, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células progenitoras o madre, en particular células progenitoras o madre hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc. En un modo de realización preferente, la célula usada para el tratamiento génico es autógeno del sujeto.

D2. Tratamiento con vacunas

40 Se pueden usar los anticuerpos de la invención para inducir una respuesta inmunitaria frente a un agente inmunogénico o antigénico, incluyendo pero no limitados a, antígenos del cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas. Las composiciones de vacuna de la invención comprenden uno o más agentes inmunogénicos o antigénicos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria, en las que se recubre uno o más agentes inmunogénicos o antigénicos con un anticuerpo de la invención. Las composiciones de vacuna de la invención son particularmente eficaces en suscitar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora frente al agente inmunogénico o antigénico, que puede ser un virus frente al que se desea una respuesta inmunitaria, o un antígeno procedente de otros patógenos víricos o no víricos.

45 Aún en otros modos de realización, la invención engloba virus o células patógenas, preferentemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo en su superficie. Se puede inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición de la invención. Preferentemente una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente inmunogénico o antigénico recubierto con un anticuerpo de la invención.

D3. Dirigir liposomas u otros microportadores y nanoportadores

50 En algunos modos de realización, se pueden usar los anticuerpos de la invención para preparar liposomas dirigidos para administrar una composición terapéutica deseada (por ejemplo, agentes antineoplásicos) a una célula diana. La preparación y uso de inmunoliposomas para la administración dirigida de fármacos antitumorales se analiza en Mastrobattista *et al.* (1999) Advanced Drug Delivery Reviews 40:103-127. Los liposomas son estructuras vesiculares basadas en bicapas lipídicas. Pueden ser tan pequeñas como de 20 nm y tan grandes como de 10 µm de diámetro. Pueden ser unilaminares (únicamente una bicapa rodea un núcleo acuoso) o multilaminares (dos o más bicapas orientadas concéntricamente alrededor de un núcleo acuoso). En la técnica es bien conocido dirigir liposomas usando una variedad de agentes dirigidos (por ejemplo, los anticuerpos de la invención). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.957.773 y 4.603.044. Se pueden usar procedimientos estándar para acoplar agentes dirigidos a liposomas. Se pueden construir liposomas dirigidos con anticuerpos usando, 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. (EE. UU.) 87:2448-2451.

5 En un modo de realización preferente, los liposomas se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándar, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos está generalmente dictada por la consideración, por ejemplo, del tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Están disponibles una variedad de procedimientos para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka, *et al.* (1980) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; las patentes de EE. UU. n.ºs 4.235.871; 4.501.728; y 4.837.028. Un procedimiento produce vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. En este procedimiento, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un sistema de disolventes o disolvente orgánico adecuado y se secan a vacío o un gas inerte para formar una película lipídica delgada. Si se desea, se puede redisolverse la película en un disolvente adecuado, tal como *tert*-butanol, y entonces liofilizar para formar una mezcla lipídica más homogénea que esté en una forma similar a polvo más fácilmente hidratada. Esta película se cubre con una solución acuosa del fármaco diana y el componente diana (anticuerpo) y se deja que se hidrate, típicamente durante un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaños de las vesículas multilaminares resultantes se puede desplazar hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizantes, tales como desoxicolato.

D4. Inmunoanálisis

Se pueden usar los anticuerpos de la invención para detectar el complejo BCR, BCR, CD79a, CD79b o células que expresan dichas moléculas. Se pueden usar cualquiera de un número de procedimientos para lograr dicha detección. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de unión inmunológicos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Para un análisis de los inmunoanálisis generales, véase también Asai (ed. 1993) Methods in Cell Biology Vol. 37, Academic Press, Nueva York; Stites & Terr (eds. 1991) Basic and Clinical Immunology 7.º ed.

De esta manera, la presente invención proporciona procedimientos para detectar células que expresan BCR y proteínas asociadas. En un procedimiento, se realiza una biopsia en el sujeto y el tejido obtenido se somete a prueba *in vitro*. Entonces, se pone en contacto el tejido o células del tejido con un anticuerpo de la invención. Cualquier inmunocomplejo que resulte indica la presencia de una proteína diana en la muestra de biopsia. Para facilitar dicha detección, el anticuerpo se puede radiomarcarse o acoplar a una molécula efectora que sea un marcador detectable, tal como un radiomarcador. En otro procedimiento, las células se pueden detectar *in vivo* usando sistemas de formación de imágenes típicos. Entonces, se determina la localización del marcador mediante cualquiera de los procedimientos conocidos para detectar el marcador. Se puede usar un procedimiento convencional para visualizar el diagnóstico por la imagen. Por ejemplo, se pueden usar isótopos paramagnéticos para RMN. La internalización del anticuerpo puede ser importante para prolongar la vida en el organismo más allá de la proporcionada por la unión extracelular, que es susceptible a aclaramiento por el entorno enzimático extracelular acoplado con un aclaramiento circulatorio.

También se pueden detectar proteínas de BCR usando procedimientos de inmunoanálisis y los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, los procedimientos estándar incluyen radioinmunoanálisis, procedimientos inmunocromatográficos, inmunoanálisis de tipo sándwich (incluyendo ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, inmunoelectrotransferencia, cromatografía de afinidad (ligando de afinidad unido a una fase sólida) y detección *in situ* con anticuerpos marcados.

Una vez descrita generalmente la invención, se entenderá más fácilmente la misma a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Ejemplo ELISA de unión directa

45 Se realizaron ELISA como sigue: Se recubrió 50 µl/pocillo de 0,5 µg/ml de sBCRC-Fc ("BCRC" se refiere al complejo BCR) en una placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4 °C durante la noche. La placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y entonces se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de someter a prueba los anticuerpos. Las variantes de anticuerpos se diluyeron en una serie de diluciones de dos veces partiendo de 0,15 µg/ml, y se añadieron a 50 µl/pocillo a la placa que contenía el sBCRC-Fc. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar tres veces con PBS-T, se añadió a la placa 50 µl/pocillo de F(ab')₂ de anti-IgG humana de cabra F(ab')₂ conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida 1:10.000 (Jackson ImmunoResearch). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se reveló con 80 µl/pocillo de sustrato de TMB. Tras 5 minutos de incubación, se detuvo la reacción mediante 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la OD450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. La lectura se representó usando el software GraphPadPrism 3.03.

Se realizaron tres ELISA diferentes de acuerdo con el protocolo expuesto anteriormente. El primer ELISA examinó la unión de anticuerpos que tenían diversas cadenas ligeras, incluyendo los anticuerpos chBCC2, hBCC, hLc-2/chHc, hLc-3/chHc, hLc-4/chHc y hLc-1/chHc. Los resultados se muestran en la figura 4. El segundo ELISA examinó la

ES 2 589 912 T3

unión de anticuerpos que tenían diversas cadenas pesadas, incluyendo los anticuerpos chLc/hHc-1, chLc/hHc-2, chLc/hHc-3, chLc/hHc-4, chLc/hHc-5, chLc/hHc-6, chBCC2 y hBCC. Para el anticuerpo chLc/hHc-6, se usó solo medio como control negativo en lugar de una dilución de 0,019 µg/ml. Los resultados se muestran en la figura 5. El tercer ELISA examinó la unión de anticuerpos que tenían varias cadenas ligeras y pesadas, incluyendo hLc-4/hHc-2, hLc-4/hHc-7, hLc-4/hHc-8, hLc6/hHc-2, hLc-6/hHc-7, hLc-6/hHc-8, chBCC1 y chBCC2. Se proporciona una descripción de anticuerpos sometidos a prueba en la tabla 6.

5

TABLA 6				
Designación del	Región variable de la cadena ligera		Región variable de la cadena pesada	
	Nombre	SEQ ID NO	Nombre	SEQ ID NO
chBCC1	VL de chBCC1	37	VH de chBCC1	38
chLc/hHc-1	VL de chBCC1	37	VH-1 de hBCC	22
chLc/hHc-2	VL de chBCC1	37	VH-2 de hBCC	24
chLc/hHc-3	VL de chBCC1	37	VH-3 de hBCC	26
chLc/hHc-4	VL de chBCC1	37	VH-4 de hBCC	28
chLc/hHc-5	VL de chBCC1	37	VH-5 de hBCC	30
chLc/hHc-6	VL de chBCC1	37	VH-6 de hBCC	32
hLc-1/chHc	VL-1 de hBCC	10	VH de chBCC1	38
hLc-2/chHc	VL-2 de hBCC	12	VH de chBCC1	38
hLc-3/chHc	VL-3 de hBCC	14	VH de chBCC1	38
hLc-4/chHc	VL-4 de hBCC	16	VH de chBCC1	38
hLc-4/hHc-2	VL-4 de hBCC	16	VH-2 de hBCC	24
hLc-4/hHc-7	VL-4 de hBCC	16	VH-7 de hBCC	34
hLc-4/hHc-8	VL-4 de hBCC	16	VH-8 de hBCC	36
hLc6/hHc-2	VL-6 de hBCC	20	VH-2 de hBCC	24
hLc-6/hHc-7	VL-6 de hBCC	20	VH-7 de hBCC	34
hLc-6/hHc-8	VL-6 de hBCC	20	VH-8 de hBCC	36

Listado de secuencias

<110> MacroGenics, Inc.

Johnson, Leslie S. S

Huang, Ling

5 <120> Anticuerpos específicos para el complejo BCR y procedimientos de uso de los mismos

<130> 1301.00201

<150> US 61/041,659

<151> 02-04-2008

<160> 38

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 339

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <400> 1

```

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg      60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg      120
cctggacaag gccttgaatg gattggtatg gttgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaatgt tcaaggacaa gcccacattg actggtgaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagctatg      300
ggctactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctca      339
    
```

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 2

```

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                20                25                30

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

Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50                55                60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65                70                75                80
    
```

ES 2 589 912 T3

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 3
<211> 336
<212> ADN
5 <213> Mus musculus

<400> 3

gatgttgga tgaccagac tccactcaact ttgtcggta acattggaca accagcctcc 60
atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgctaactct atctggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 4
<211> 112
10 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 589 912 T3

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
 20 25 30

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

 Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

<210> 5
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 5

gatgttggtg tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc 60
 atctcttgta agtcaagtca ggcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttgttacaga ggccaggtca gtctccaaag cgcctaactc atctggtgtc taaactggac 180
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagggc cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttcgg 300
 ctcacgttcg gtgctggggc caagctggag ctgaaa 336

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 6

ES 2 589 912 T3

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

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

 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 7
 <211> 339
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus

<400> 7

 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgggtgagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgaatg gattggtatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
 aatcaaatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagctatg 300
 ggctactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctca 339

<210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<400> 8

ES 2 589 912 T3

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 9
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 9

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtca gaggcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttcog 300
 ctcacgttcg gccgaggggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 10

ES 2 589 912 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 11
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 11

gatgttgtga tgactcagtc tccactctoc ctgccogtca ccottggaca gccggcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttctgcaga ggccaggcca atctccaagg cgctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300
 ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 12

ES 2 589 912 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 13

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtca ggcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctocaaag cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 totgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 14

ES 2 589 912 T3

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 15

gatggttgta tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctoctgca agtcaagtc gagcctotta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctocaaac cgcotaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctggggctc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 15 <400> 16

ES 2 589 912 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 17

gatgttgatga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 tttctgcaga ggccaggcca atctccaaag cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaagggtac acattttccg 300
 ctcacgttcg gccgaggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

15 <400> 18

ES 2 589 912 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 336
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 19
gatggttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
tttctgcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
ctcacgttcg ggggagggac caagcttgag atcaaa 336

10 <210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Versión humanizada de secuencia murina

15 <400> 20

ES 2 589 912 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 21
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
 aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagocctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctcctca 339

10 <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

15 <400> 22

ES 2 589 912 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Met	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ala	Met	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		

Ser

5 <210> 23
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 23

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
 aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcogtgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctcctca 339

10 <210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 24

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 25
- <211> 339
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 25

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgocctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaatgt tcaaggacaa agccaccctg accgtagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaaggagac cacggtcacc gtctcctca                                339
  
```

- 10 <210> 26
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 15 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 26

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 27
- <211> 339
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 27

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatoctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctcctca                                339
    
```

- 10 <210> 28
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 15 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 28

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

- <210> 29
- <211> 339
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

- <220>
- <223> Versión humanizada de secuencia murina
- <400> 29

```
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaattgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctctca                                339
```

- 10 <210> 30
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 15 <223> Versión humanizada de secuencia murina
- <400> 30

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 31
- <211> 339
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 31

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc      60
tctgtcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaaagt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctcctca                                  339
    
```

- 10 <210> 32
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

15 <400> 32

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 33
- <211> 339
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 5 <220>
- <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 33

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc      60
tctctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaaagt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcctgtg attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctctca                                     339
    
```

- 10 <210> 34
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Versión humanizada de secuencia murina

15 <400> 34

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 35
- <211> 339
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 35

```

caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac      180
aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcctgtg attactgtgc gagagctatg      300
ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctcctca                                  339
    
```

- 10 <210> 36
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 36

ES 2 589 912 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- <210> 37
- <211> 112
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina

<400> 37

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
 20 25 30

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

ES 2 589 912 T3

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Versión humanizada de secuencia murina
 <400> 38

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

10

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que se une al complejo receptor de linfocitos B (BCR) humano, en el que dicho polipéptido comprende:
 - (I) la secuencia aminoacídica de una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que es una variante humanizada de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo para el complejo BCR natural (V_L DE BCC), en la que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20; y
 - (II) la secuencia aminoacídica de una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que es una variante humanizada de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo para el complejo BCR natural (V_H DE BCC), en la que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) está seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 36.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) es SEQ ID NO: 12.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) es SEQ ID NO: 14.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) es SEQ ID NO: 16.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) es SEQ ID NO: 18.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) es SEQ ID NO: 20.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) es SEQ ID NO: 26.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) es SEQ ID NO: 28.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) es SEQ ID NO: 30.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia aminoacídica de dicha región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) es SEQ ID NO: 36.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polipéptido es un anticuerpo monocatenario o un diacuerpo.
12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que dicho polipéptido comprende un dominio Fc de variante que comprende al menos una modificación en el dominio Fc con respecto a un dominio Fc natural.
13. El polipéptido de la reivindicación 12, en el que dicha modificación comprende:
 - (A) al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F243L, D270E, R292P, S298N, Y300L, V305I, A330V y P396L;
 - (B) al menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L y P396L; F243L y R292P; y R292P y V305I;
 - (C) al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P y Y300L; F243L, R292P y V305I; F243L, R292P y P396L; y R292P, V305I y P396L;
 - (D) al menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en F243L, R292P, Y300L y P396L; y F243L, R292P, V305I y P396L; o
 - (E) al menos las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L

14. El polipéptido de la reivindicación 13, en el que dicho dominio Fc de variante muestra una función efectora alterada en comparación con un dominio Fc natural, en el que dicha función efectora alterada está seleccionada del grupo que consiste en:
- (A) función de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) potenciada;
 - 5 (B) función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) potenciada;
 - (C) unión incrementada a un FcγR de activación en comparación con un dominio Fc natural;
 - (D) unión disminuida a FcγRIIB en comparación con un dominio Fc natural; o
 - (E) unión incrementada a FcγRIIB en comparación con un dominio Fc natural.
- 10 15. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho polipéptido es un fragmento F(ab')₂, un anticuerpo monoclonal, un fragmento F(ab), un anticuerpo monocatenario o un diacuerpo; opcionalmente en el que dicho polipéptido está ligado de manera funcional a un polipéptido heterólogo.
16. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes
- 15 17. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad inflamatoria mediada por mecanismos inmunitarios o autoinmunitarios
- 20 19. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho uso se encuentra en el tratamiento de un cáncer hematopoyético.
- 25 20. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho uso se encuentra en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria mediada por mecanismos inmunitarios o autoinmunitarios, preferentemente en el que dicha enfermedad inflamatoria mediada por mecanismos inmunitarios o autoinmunitarios está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, soriasis, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, diabetes de tipo 1, vasculitis; asma, eccema y dermatitis atópica, fibrosis, rechazo de injerto, enfermedad injerto contra huésped y enfermedad intestinal inflamatoria.
- 30 21. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18, 19 o 20, en el que dicho tratamiento comprende la etapa de administrar un segundo agente terapéutico simultánea o secuencialmente con el anticuerpo.

35

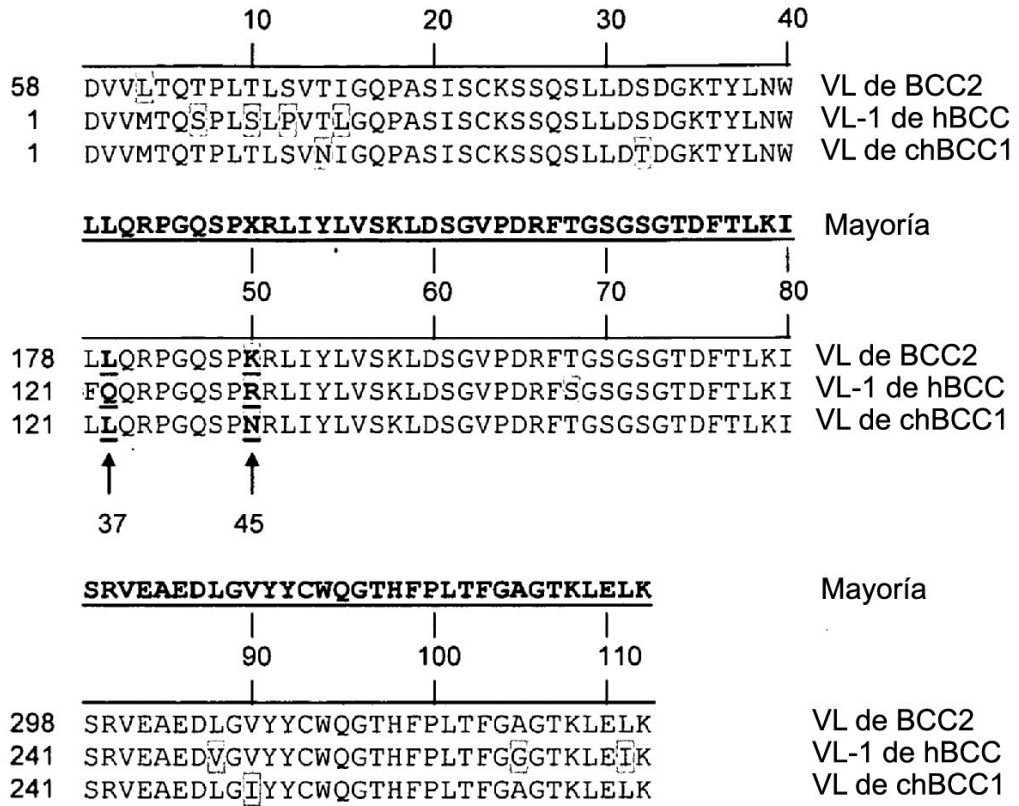


Figura 1

	Kabat n.º			Kabat n.º						
	37	45		48	62	66	67	69	71	73
chVL	L	K/N	chVH	I	M	K	A	L	V	K
hVL	Q	R	hVH	M	M	R	V	M	T	T
hVL-2	<u>L</u>	R	hVH-2	<u>I</u>	M	R	V	M	T	T
hVL-3	Q	<u>K</u>	hVH-3	M	M	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	T
hVL-4	Q	<u>N</u>	hVH-4	M	M	R	V	M	<u>V</u>	T
hVL-5*	L	<u>K</u>	hVH-5	M	M	R	V	M	<u>V</u>	<u>K</u>
hVL-6	<u>L</u>	N	hVH-6	M	<u>K</u>	R	V	M	T	T
			hVH-7	I	<u>K</u>	R	V	M	T	T
			hVH-8	I	<u>M</u>	R	V	M	V	T

Figura 2

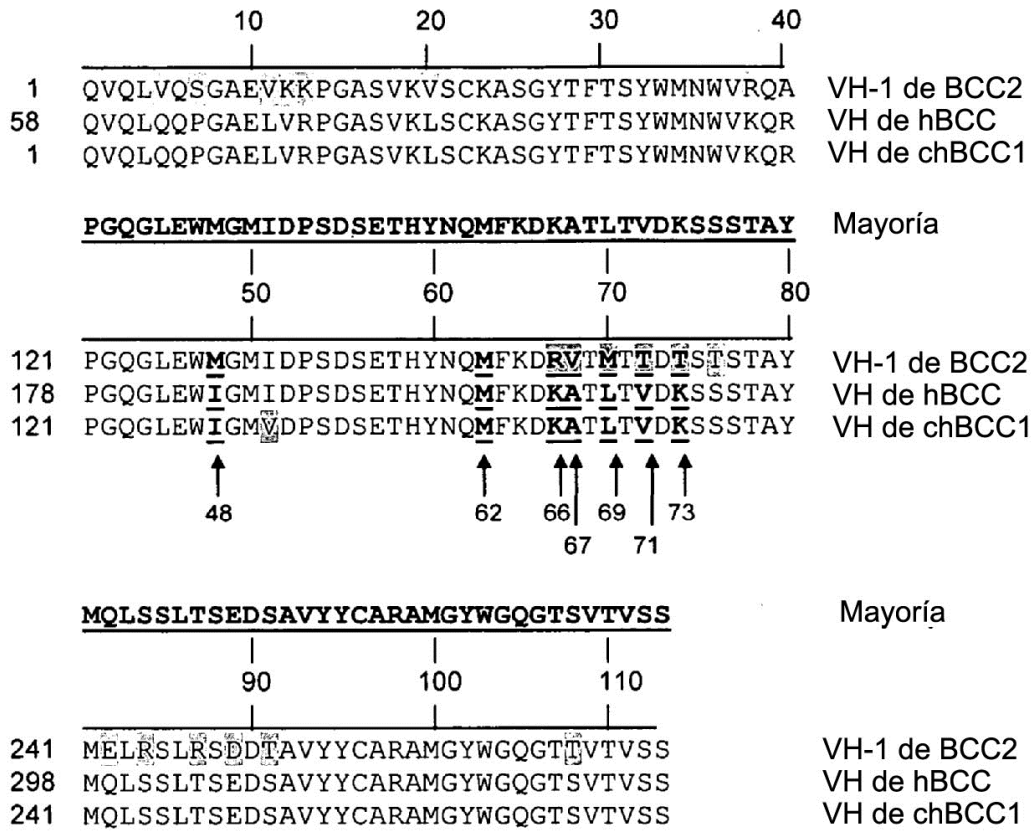


Figura 3

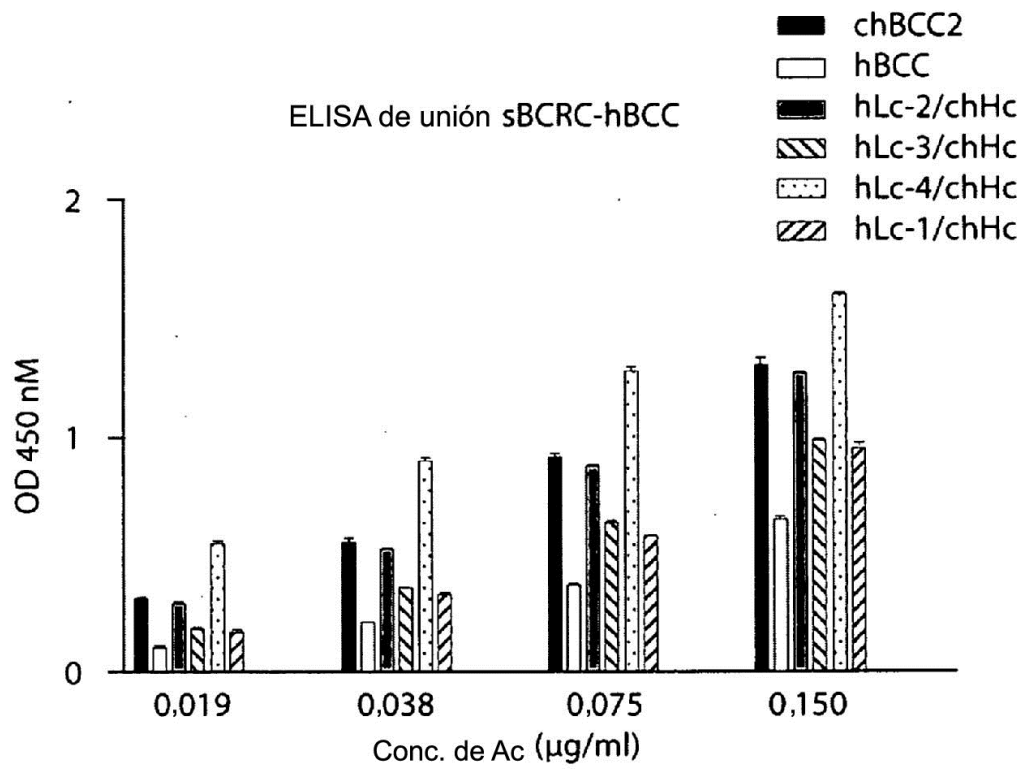


Figura 4

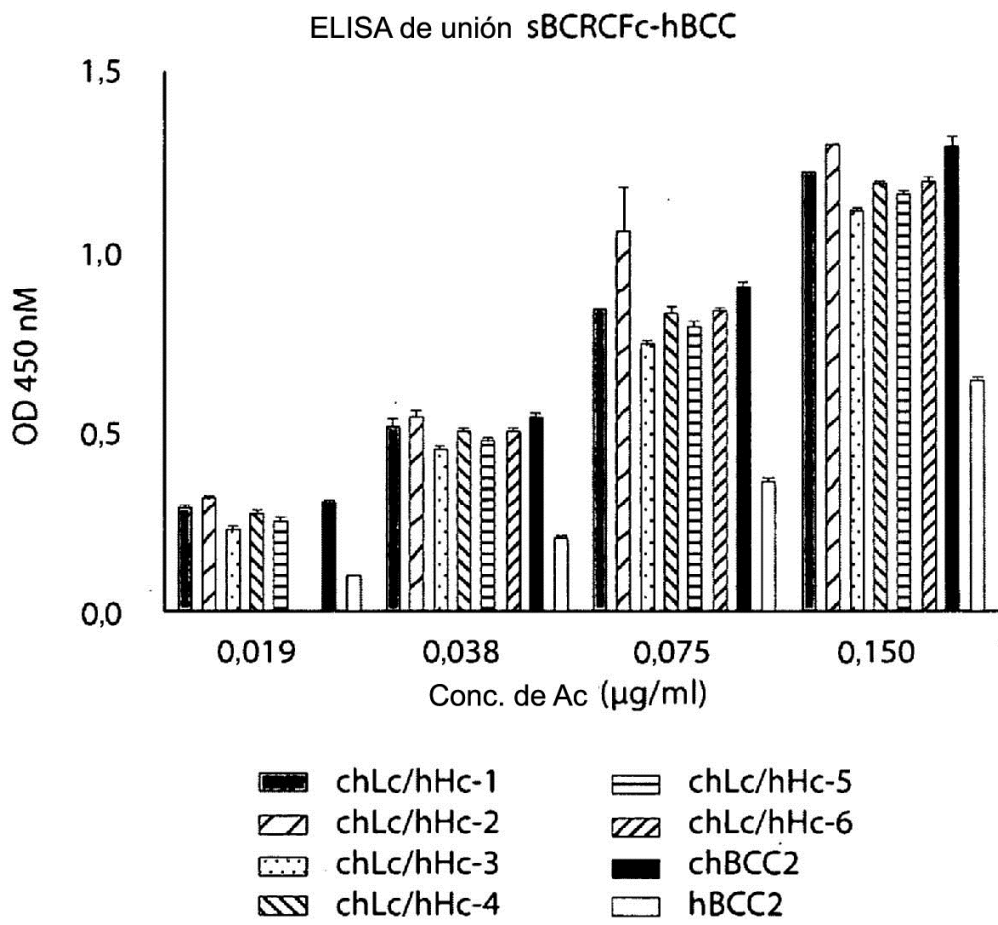


Figura 5

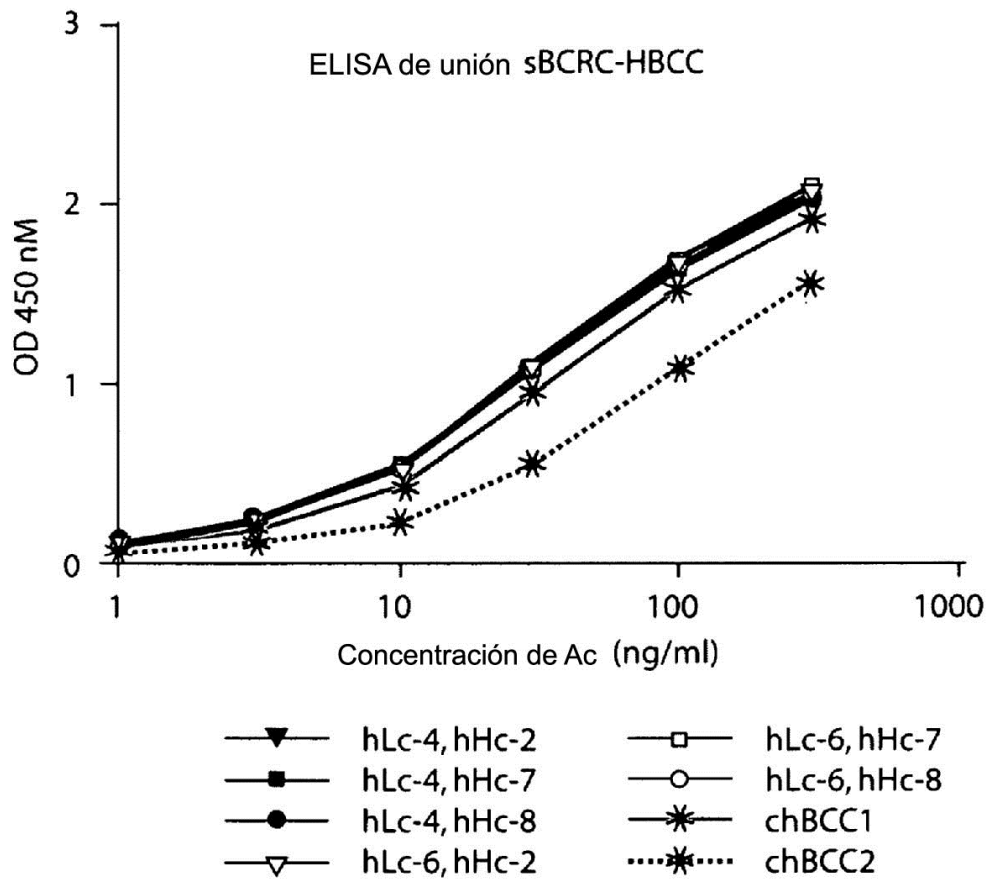


Figura 6