

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 319**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2007 PCT/US2007/072153**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2008 WO08019199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2007 E 07812341 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2029173**

54 Título: **Anticuerpos específicos de Fc RIIB y métodos de uso de éstos**

30 Prioridad:

**26.06.2006 US 816688 P**

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

**01.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOHNSON, LESLIE, S.;  
HUANG, LING y  
GERENA, ROBYN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 599 319 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 de Fc RIIB y métodos de uso de éstos

### 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere, como se especifica por las reivindicaciones, a anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano. La presente especificación también engloba el uso de un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, como terapia con único agente para el tratamiento, prevención, gestión, o mejora de un cáncer, preferiblemente una malignidad de células B, particularmente, leucemia linfocítica crónica de células B o linfoma no de Hodgkin, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico mediado por IgE, o uno o más síntomas de éstos. Dicho uso también puede incluir la combinación con otras terapias del cáncer. La presente especificación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, en cantidades efectivas para prevenir, tratar, gestionar, o mejorar un cáncer, tal como una malignidad de células B, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico mediado por IgE, o uno o más síntomas de éstos. Las realizaciones preferidas de la invención se muestran en las reivindicaciones dependientes. También se describen métodos para aumentar el efecto terapéutico de anticuerpos terapéuticos mediante la administración de los anticuerpos de la invención para aumentar la función efectora de los anticuerpos terapéuticos. Además, también se describen métodos para aumentar la eficacia de una composición de vacuna mediante la administración de los anticuerpos de la invención con una composición de vacuna.

### 2. Antecedentes de la invención

#### 2.1 Receptores Fc y sus papeles en el sistema inmune

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

Los receptores Fc, miembros de la superfamilia de proteínas de genes de inmunoglobulina, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la parte 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 para subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores Fc para IgG se refieren como FcγR, para IgE como FcεR, y para IgA como FcαR. Las diferentes células auxiliares portan receptores Fc para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares estarán implicadas en una respuesta dada (revisado por Ravetch J.V. et al. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. et al. 2001 Microbes and Infection, 3: 131-139; Billadeau D.D. et al. 2002, The Journal of Clinical Investigation, 2(109): 161-1681; Ravetch J.V. et al. 2000, Science, 290: 84-89; Ravetch J.V. et al., 2001 Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. 1994, Cell, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores Fc, las células que los expresan, y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptada de Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4a ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York). Otra técnica anterior incluye WO 2005115452 que se refiere a anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano. También describe el uso de un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, como terapia con un único agente para el tratamiento, prevención, gestión o mejora de un cáncer, preferiblemente una malignidad de células B, particularmente, leucemia linfocítica crónica de células B o linfoma no de Hodgkin, un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno alérgico mediado por IgE, o uno o más síntomas de éstos. También se describen métodos para aumentar el efecto terapéutico de anticuerpos terapéuticos mediante la administración de los anticuerpos descritos en ese documento para aumentar la función efectora de los anticuerpos terapéuticos, y métodos para aumentar la eficacia de una composición de vacuna mediante la administración de los anticuerpos de la invención.

WO 2007021841 se refiere a moléculas, particularmente polipéptidos, más particularmente inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), que comprenden una región Fc variante, en las que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido respecto a una región Fc de tipo salvaje, región Fc variante que se une a FcγRIIA y/o FcγRIIA con una mayor afinidad, respecto a una molécula comparable que comprende la región Fc de tipo salvaje. Las moléculas se describen como particularmente útiles para la prevención, tratamiento, o mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección; para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno en el que se desea una eficacia aumentada de función de celular efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa; y para aumentar la eficacia terapéutica de

anticuerpos terapéuticos, cuyo efecto está mediado por ADCC.

Receptores Fcγ

5 Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulina, un único dominio a través de la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Hay tres FcγR conocidos, designados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), y FcγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por distintos genes; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgen de un progenitor común quizá por duplicación génica. Esta invención se centra específicamente en FcγRII(CD32).

FcγRII(CD32)

10 Las proteínas FcγRII son glicoproteínas integrales de membrana de 40 KDa que se unen sólo a IgG formando complejo debido a una baja afinidad por Ig monomérica ( $10^6 M^{-1}$ ). Este receptor es el FcγR más ampliamente expresado, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos, y plaquetas. FcγRII tiene sólo dos regiones semejantes a inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y por lo tanto una afinidad mucho menor por IgG que FcγRI. Hay tres genes humanos de FcγRII (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), todos los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunes.

Las diferencias claras en los dominios citoplásmicos de FcγRII-A (CD32A) y FcγRII-B (CD32B) crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que da lugar a la activación celular tal como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras la isoforma B inicia señales inhibitoras, por ejemplo, la inhibición de la activación de las células B.

20 Señalización a través de los FcγR

Tanto las señales activadoras como inhibitoras se transducen a través de los FcγR después de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios distintos en los dominios de señalización citoplásmica del receptor denominados restos de activación basados en tirosina de inmunoreceptor (ITAM) o restos inhibitoros basados en tirosina de inmunoreceptor (ITIM) son los responsables de las diferentes respuestas. El reclutamiento 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, mientras los complejos que contienen ITIM sólo incluyen FcγRIIB.

30 Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. El agrupamiento de FcγRIIA mediante complejos inmunes o entrecruzamiento de anticuerpo específico sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas a receptor lo que facilita la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de anclaje para la quinasa Syk, cuya activación resulta en la activación de sustratos aguas abajo (por ejemplo, PI<sub>3</sub>K). La activación celular da lugar a la liberación de mediadores proinflamatorios.

35 El gen de FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico a FcγRIIA y se une a complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibitora de FcγR. Recientemente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza mensajeros fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando consecuentemente el influjo de Ca<sup>++</sup> intracelular. Así, el entrecruzamiento de FcγRIIB disminuye la respuesta activadora a la ligación de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. Se cancela así la activación de las células B, proliferación de las células B y la secreción de anticuerpos.

**Tabla 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulina**

Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-BI (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
Unión	IgG1 $10^8 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^5 M^{-1}$	IgG1 $10^{10} M^{-1}$	IgG1, IgA2 $10^7 M^{-1}$
Tipo celular	Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas	Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas, células	Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos	Células B, mastocitos	Células NK, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos	Mastocitos, eosinófilos, basófilos	Macrófagos, neutrófilos, eosinófilos

Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
		de Langerhan					
<b>Efecto de la ligación</b>	Captación, estimulación activación de estallido respiratorio, inducción de muerte	Captación, liberación de gránulos	Captación, inhibición de estimulación	No captación, inhibición de estimulación	Inducción de muerte	Secreción de gránulos	Captación, inducción de muerte

## 2.2 Enfermedades de relevancia

### 2.2.1 Cáncer

5 Un neoplasma, o tumor, es una masa neoplásica que resulta del crecimiento celular anormal incontrolado que puede ser benigno o maligno. Los tumores benignos generalmente permanecen localizados. Los tumores malignos se denominan colectivamente cánceres. El término "maligno" significa generalmente que el tumor puede invadir y destruir estructuras corporales vecinas y diseminarse a sitios distantes para causar la muerte (para revisión, véase, Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2a Ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, p. 68-122). El cáncer puede surgir en muchos sitios del cuerpo y se comporta de manera diferente dependiendo de su origen. Las células cancerosas destruyen la parte del cuerpo en la que se originan y entonces se diseminan a otra parte o partes del cuerpo donde empiezan un nuevo crecimiento y causan más destrucción.

15 Más de 1,2 millones de americanos desarrollan cáncer cada año. El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos y si su tendencia actual continúa, se espera que el cáncer sea la causa principal de muerte en el año 2010. El cáncer de pulmón y de próstata son los cánceres que causan más muertes en hombres en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón y de mama son los cánceres que causan más muertes en mujeres en los Estados Unidos. A uno de cada dos hombres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento durante su vida. A una de cada tres mujeres en los Estados Unidos se le diagnosticará cáncer en algún momento durante su vida. Todavía no se ha encontrado una cura para el cáncer. Las opciones de tratamiento actuales, tales como cirugía, quimioterapia y tratamiento con radiación, son muchas veces bien inefectivos o presentan efectos secundarios graves.

#### 2.2.1.1 Malignidades de células B

25 Las malignidades de células B, incluyendo, pero no limitado a, linfomas y leucemias de células B, son enfermedades neoplásicas con incidencia significativa en los Estados Unidos. Hay aproximadamente 55.000 nuevos casos de linfoma al año en los EEUU (datos de 1998), con 25.000 muertes estimadas al año. Esto representa el 4% de incidencia del cáncer y el 4% de todas las muertes relacionadas con cáncer en la población de los EEUU. La clasificación Europea-Americana revisada de neoplasmas linfoides (1994 clasificación REAL, modificada 1999) agrupó los linfomas sobre la base de su origen bien como linfoma del linaje de células B, linfoma del linaje de células T, o linfoma de Hodgkin. El linfoma del linaje de células B es el tipo más común de linfoma no de Hodgkin (NHL) diagnosticado en los EEUU (Williams, Hematology 6a ed. (Beutler et al. Ed.), McGraw Hill 2001).

30 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es una enfermedad neoplásica caracterizada por la acumulación de linfocitos pequeños con apariencia de maduros en los tejidos de la sangre, médula, y linfoides. CLL tiene una incidencia de 2,7 casos por 100.000 en los EEUU. El riesgo se incrementa progresivamente con la edad, particularmente en los hombres. Representa el 0,8% de todos los cánceres y es la leucemia más común en adultos, responsable del 30% de todas las leucemias. En casi todos los casos (>98%) las células enfermas pertenecen al linaje de linfocitos B. Una variante no leucémica, el linfoma linfocítico pequeño, constituye el 5-10% de todos los linfomas, tiene características histológicas, morfológicas e inmunológicas indistinguibles de las de los nódulos linfáticos implicados en pacientes con B-CLL (Williams, 2001).

40 El historial natural de la leucemia linfocítica crónica presenta varias fases. En la fase temprana, la leucemia linfocítica crónica es una enfermedad indolente, caracterizada por la acumulación de células B malignas, pequeñas, maduras, funcionalmente incompetentes que tienen una vida alargada. Eventualmente, el tiempo de duplicación de las células B malignas disminuye y los pacientes se vuelven cada vez más sintomáticos. Aunque el tratamiento con agentes quimioterapéuticos puede proporcionar alivio sintomático, la supervivencia global de los pacientes sólo se extiende mínimamente. Los estadios tardíos de la leucemia linfocítica crónica se caracterizan por anemia significativa y/o trombocitopenia. En este punto, la supervivencia media es menos de dos años (Foon et al., 1990, Annals Int. Medicine 113:525). Debido a la muy baja velocidad de proliferación celular, la leucemia linfocítica crónica

es resistente a tratamiento con agentes quimioterapéuticos.

Recientemente, estudios de expresión génica han identificado varios genes que pueden estar regulados al alza en los trastornos linfoproliferativos. Una molécula que se cree que está sobre-expresada en pacientes con leucemia linfocítica crónica de células (B-CLL) y en una fracción grande de pacientes con linfoma no de Hodgkin es CD32B (Alizadeh et al., 2000, Nature 403:503-511; Rosenwald et al., 2001, J. Exp. Med. 184:1639-1647). Sin embargo, el papel de CD32B en B-CLL no está claro ya que una publicación demuestra que CD32B se expresaba en un bajo porcentaje de células de B-CLL y a una baja densidad (Damle et al., 2002, Blood 99:4087-4093). CD32B es un antígeno de superficie del linaje de células B, cuya sobre-expresión en neoplasia de células B lo hace una diana adecuada para anticuerpos terapéuticos. Además, CD32B pertenece a la categoría de receptores inhibidores, cuya ligación proporciona una señal negativa. Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos frente a CD32B podrían funcionar para eliminar células tumorales por mecanismos que incluyen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), pero también desencadenar una señal apoptótica. La alta homología de CD32B con su equivalente, CD32A, un receptor Fc $\gamma$  activador, ha dificultado hasta ahora la generación de anticuerpos que reconocen selectivamente una y no la otra forma de la molécula.

### 2.2.1.2 Terapia del cáncer

Actualmente, la terapia del cáncer puede implicar cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o tratamiento con radiación para erradicar las células neoplásicas en un paciente (Véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en Scientific American: Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., Capítulo 12, Sección IV). Recientemente, la terapia del cáncer también podría implicar terapia biológica o inmunoterapia. Todas estas estrategias presentan inconvenientes significativos para el paciente. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud del paciente o puede ser inaceptable para el paciente. Además, la cirugía puede no eliminar completamente el tejido neoplásico. La terapia con radiación es sólo efectiva cuando el tejido neoplásico presenta una mayor sensibilidad a la radiación que el tejido normal, y la terapia con radiación también puede incitar frecuentemente efectos secundarios graves. La terapia hormonal se proporciona raramente como un único agente y aunque puede ser efectiva, se usa frecuentemente para prevenir o retrasar la recurrencia del cáncer frecuentemente después de que otros tratamientos hayan eliminado la mayoría de las células cancerosas. Las terapias biológicas/inmunoterapias están limitadas en número y pueden producir efectos secundarios tales como enrojecimientos o hinchazón, síntomas semejantes a la gripe, incluyendo fiebre, escalofríos y fatiga, problemas en el tracto digestivo o reacciones alérgicas.

Respecto a la quimioterapia, hay una variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para el tratamiento del cáncer. Una mayoría significativa de agentes quimioterapéuticos para el cáncer actúan inhibiendo la síntesis de ADN, bien directamente, o indirectamente mediante la inhibición de la biosíntesis de los precursores de desoxiribonucleótidos trifosfato, para evitar la replicación del ADN y la división celular concomitante (Véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Octava Ed. (Pergamon Press, Nueva York, 1990)). Estos agentes, que incluyen agentes alquilantes, tales como nitrosourea, anti-metabolitos, tales como metotrexato e hidroxurea, y otros agentes, tales como etopósidos, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, daunorrubicina, etc., aunque no sean necesariamente específicos del ciclo celular, matan a las células durante la fase S debido a su efecto en la replicación del ADN. Otros agentes, específicamente colchicina y los alcaloides de vinca, tales como vinblastina y vincristina, interfieren con el ensamblaje de microtúbulos resultando en parada mitótica. Los protocolos de quimioterapia generalmente implican la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos para incrementar la eficacia del tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de una variedad de agentes quimioterapéuticos la quimioterapia tiene muchos inconvenientes (Véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein y Federman, eds., ch. 12, secc. 10). Casi todos los agentes quimioterapéuticos son tóxicos, y la quimioterapia causa efectos secundarios significativos, y frecuentemente peligrosos, incluyendo náusea severa, depresión de la médula ósea, inmunosupresión, etc. Además, incluso con la administración de combinaciones de agentes quimioterapéuticos, muchas células tumorales son resistentes o desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos. De hecho, aquellas células resistentes a los agentes quimioterapéuticos particulares usados en el protocolo de tratamiento se muestran frecuentemente resistentes a otros fármacos, incluso aquellos agentes que actúan por mecanismos diferentes de los mecanismos de acción de los fármacos usados en el tratamiento específico; este fenómeno se denomina resistencia a fármaco pleiotrópica o resistencia a múltiples fármacos. Así, debido a la resistencia a fármacos, muchos cánceres se muestran refractarios a protocolos de tratamiento quimioterapéutico estándar.

La malignidad de células B se trata generalmente con quimioterapia de un único agente, quimioterapia de combinación y/o terapia con radiación. Estos tratamientos pueden reducir la morbilidad y/o mejorar la supervivencia, no obstante poseen efectos secundarios significativos. La respuesta de las malignidades de células B a varias formas de tratamiento es mixta. Por ejemplo, en los casos en los que es posible un estadiaje clínico adecuado de linfoma no de Hodgkin, la terapia con radiación de campo puede proporcionar un tratamiento satisfactorio. Determinados pacientes, sin embargo, no responden y la recurrencia de la enfermedad con resistencia a tratamiento resulta con el tiempo, particularmente con las variantes más agresivas de la enfermedad. Aproximadamente la mitad de los pacientes muere de la enfermedad (Devesa et al., 1987, J. Nat'l Cancer Inst. 79:701).

Las terapias investigacionales para el tratamiento de neoplasia de células B refractaria incluyen trasplante de médula ósea o células madre autólogo o alogénico y terapias génicas. Recientemente, se ha introducido inmunoterapia usando anticuerpos monoclonales para tomar como diana antígenos específicos de células B en el tratamiento de la neoplasia de células B. El uso de anticuerpos monoclonales para dirigir radionúclidos, toxinas, u otros agentes terapéuticos ofrece la posibilidad de que dichos agentes puedan administrarse selectivamente a sitios tumorales, limitando así la toxicidad para los tejidos normales.

Existe una necesidad significativa para tratamientos del cáncer alternativos, particularmente para el tratamiento de cáncer que se ha mostrado refractario a tratamientos de cáncer estándar, tales como cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, y terapia hormonal. Una alternativa prometedora es la inmunoterapia, en la que las células cancerosas se toman como diana específicamente por anticuerpos específicos de antígeno del cáncer. Los mayores esfuerzos se han dirigido a aprovechar la especificidad de la respuesta inmune, por ejemplo, la tecnología del hibridoma ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales selectivos para tumor (Véase, Green M.C. et al., 2000 Cancer Treat Rev., 26: 269-286; Weiner LM, 1999 Semin Oncol. 26(supl. 14):43-51), y en los últimos años, la Administración de Alimentos y Fármacos ha aprobado los primeros MAb para terapia del cáncer: Rituxina (anti-CD20) para linfoma no de Hodgkin, Campath (anti-CD52) para leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y Herceptina [anti-(c-erb-2/HER-2)] para cáncer de mama metastásico (Suzanne A. Eccles, 2001, Breast Cancer Res., 3: 86-90). NHL y B-CLL son dos de las formas más comunes de neoplasia de células B. Se ha demostrado que estos anticuerpos tienen eficacia clínica, pero su uso no carece de efectos secundarios. La potencia de la función efectora del anticuerpo, por ejemplo, para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC") es un obstáculo de dicho tratamiento. Además, con Rituxan y Campath, al menos la mitad de los pacientes no responden y una fracción de los respondedores puede ser refractario a tratamientos posteriores.

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

### 2.2.2 Enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes

La inflamación es un proceso por el que las células blancas de la sangre y químicos del cuerpo protegen nuestros cuerpos frente a la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Se caracteriza habitualmente por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento del área afectada. Los químicos conocidos como citoquinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada ordenada y auto-limitante en la sangre o tejidos afectados. Esta liberación de químicos incrementa el flujo de sangre al área de la lesión o infección, y puede resultar en el enrojecimiento y calor. Algunos de los químicos causan la extravasación de fluido en los tejidos, resultando en hinchazón. Este proceso protector puede estimular los nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un periodo limitado en el área relevante, funcionan para beneficio del cuerpo.

En los trastornos autoinmunes y/o inflamatorios, el sistema inmune desencadena una respuesta inflamatoria cuando no hay sustancias extrañas contra las que luchar y el sistema inmune normalmente protector del cuerpo causa daño a sus propios tejidos atacándose por error a sí mismo. Hay muchos trastornos autoinmunes diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con la enfermedad de Crohn, y el sinovio, hueso y cartílago de varias articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. Al progresar los trastornos autoinmunes, puede resultar la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, crecimiento anormal de un órgano, o cambios en la función orgánica. El trastorno autoinmune puede afectar sólo a un tipo de órgano o tejido o puede afectar múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos afectados comúnmente por trastornos autoinmunes incluyen, células rojas de la sangre, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, el tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones, y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen, pero no están limitados a, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad del oído interno autoinmune, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

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

La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es potencialmente discapacitante. Hay aproximadamente 2,9 millones de incidencias de artritis reumatoide en los Estados Unidos. Están afectadas dos a tres veces más mujeres que hombres. La edad típica en la que ocurre la artritis reumatoide es entre 25 y 50. La artritis reumatoide juvenil afecta a 71.000 jóvenes americanos (con dieciocho años y menos), afectando seis veces

más a chicas que chicos.

La artritis reumatoide es un trastorno autoinmune en el que el sistema inmune del cuerpo identifica inapropiadamente las membranas sinoviales que secretan el fluido lubricante en las articulaciones como extrañas. Se produce inflamación, y el cartílago y tejidos en y alrededor de las articulaciones resultan dañados o destruidos. En los casos graves, esta inflamación se extiende a otros tejidos articulares y cartílago circundante, donde puede erosionar o destruir el hueso y cartílago y da lugar a deformidades articulares. El cuerpo reemplaza el tejido dañado con tejido cicatricial, causando que los espacios normales en las articulaciones se vuelvan estrechos y los huesos se fusionen entre sí. La artritis reumatoide crea rigidez, hinchazón, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre, y frecuentemente dolor incapacitante. Algunos síntomas comunes de la artritis reumatoide incluyen rigidez de las articulaciones al despertar que dura una hora o más; hinchazón en la articulación de un dedo o muñeca específico; hinchazón en el tejido blando alrededor de las articulaciones; e hinchazón en ambos lados de la articulación. La hinchazón puede ocurrir con o sin dolor, y puede empeorar progresivamente o permanecer igual durante años antes de progresar.

El diagnóstico de la artritis reumatoide se basa en una combinación de factores, incluyendo: la localización específica y simetría de las articulaciones dolorosas, la presencia de rigidez en las articulaciones por la mañana, la presencia de protuberancias y nódulos bajo la piel (nódulos reumatoides), resultados de ensayos de rayos X que sugieran artritis reumatoide, y/o resultados positivos en un ensayo de sangre denominado el factor reumatoide. Mucha, pero no toda, la gente con artritis reumatoide tiene el anticuerpo factor reumatoide en su sangre. El factor reumatoide puede estar presente en personas que no tienen artritis reumatoide. Otras enfermedades también pueden causar que se produzca factor reumatoide en la sangre. Esta es la razón por la que el diagnóstico de artritis reumatoide se basa en una combinación de varios factores y no sólo en la presencia de factor reumatoide en la sangre.

El curso típico de la enfermedad es uno de síntomas articulares persistentes pero fluctuantes, y después de aproximadamente 10 años, el 90% de las personas que lo padecen mostrarán daño estructural en el hueso y cartílago. Un pequeño porcentaje tendrá una enfermedad corta que desaparece completamente, y otro pequeño porcentaje tendrá una enfermedad muy grave con muchas deformidades articulares, y ocasionalmente otras manifestaciones de la enfermedad. El proceso inflamatorio causa erosión o destrucción del hueso y cartílago en las articulaciones. En la artritis reumatoide, existe un ciclo autoinmune de presentación de antígeno persistente, estimulación de células T, secreción de citoquinas, activación de células sinoviales, y destrucción de las articulaciones. La enfermedad tiene un gran impacto tanto en el individuo como en la sociedad, causando dolor significativo, función alterada y discapacidad, así como costes de millones de dólares en gastos sanitarios y sueldos por tiempo perdido. (Véase, por ejemplo, el sitio de internet de NIH y el sitio de internet de NIAID).

La terapia actualmente disponible para la artritis reumatoide se centra en reducir la inflamación de las articulaciones con medicaciones anti-inflamatorias o inmunosupresoras. La primera línea de tratamiento de cualquier artritis es habitualmente anti-inflamatorios, tales como aspirina, ibuprofeno e inhibidores de Cox-2 tales como celecoxib y rofecoxib. Los "fármacos de segunda línea" incluyen oro, metotrexato y esteroides. Aunque estos tratamientos están bien establecidos para la artritis, muy pocos pacientes remiten en estas línea de tratamiento solas. Los avances recientes en la comprensión de la patogénesis de la artritis reumatoide han dado lugar al uso de metotrexato en combinación con anticuerpos frente a citoquinas o receptores solubles recombinantes. Por ejemplo, los receptores solubles recombinantes para el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  se han usado en combinación con metotrexato en el tratamiento de la artritis. Sin embargo, sólo aproximadamente el 50% de los pacientes tratados con una combinación de metotrexato y agentes anti-TNF- $\alpha$  tales como receptores solubles recombinantes para TNF- $\alpha$  muestran una mejora clínica significativa. Muchos pacientes permanecen refractarios a pesar del tratamiento. Los problemas difíciles del tratamiento todavía permanecen para pacientes con artritis reumatoide. Muchos tratamientos actuales tienen una alta incidencia de efectos secundarios o no pueden prevenir completamente la progresión de la enfermedad. Hasta ahora, no hay ningún tratamiento ideal, y no hay cura. Se necesitan nuevos terapéuticos que traten más eficazmente la artritis reumatoide y otros trastornos autoinmunes.

### 2.2.3 Alergia

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

Se han identificado y caracterizado dos receptores con diferentes afinidades para IgE. El receptor de alta afinidad

(FcεRI) se expresa en la superficie de mastocitos y basófilos. El receptor de baja afinidad (FcεRII/CD23) se expresa en muchos tipos celulares incluyendo células B, células T, macrófagos, eosinófilos y células de Langerhan. El receptor de alta afinidad de IgE consiste en tres subunidades (cadenas alfa, beta y gamma). Varios estudios demuestran que sólo la cadena alfa está implicada en la unión de IgE, mientras las cadenas beta y gamma (que son proteínas bien transmembrana o citoplásmicas) se requieren para los eventos de transducción de la señal. La identificación de estructuras de IgE requeridas para que IgE se una al FcεRI en mastocitos y basófilos tiene una máxima importancia para averiguar estrategias de tratamiento o prevención de alergias mediadas por IgE. Por ejemplo, la elucidación del sitio de unión al receptor de IgE podría dar lugar a la identificación de péptidos o moléculas pequeñas que bloquean la unión de IgE a células que presentan el receptor *in vivo*.

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

Una estrategia para el tratamiento de los trastornos alérgico tipo I ha sido la producción de anticuerpos monoclonales que reaccionan con IgE soluble (libre) en suero, bloquean la unión de IgE a su receptor en mastocitos y basófilos, y no se unen a IgE unida a receptor (es decir, no son anafylactogénicos). Dos de dichos anticuerpos monoclonales están en estadios avanzados de desarrollo clínico para el tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE (véase, por ejemplo, Chang, T.W., 2000, Nature Biotechnology 18:157-62).

Uno de los tratamientos más prometedores para las reacciones alérgicas mediadas por IgE es la inmunización activa frente a epítomos no anafylactogénicos apropiados en IgE endógena. Stanworth et al. (Patente U.S. No. 5.601.821) describió una estrategia que implicaba el uso de un péptido derivado del dominio CεH4 de IgE humana acoplado con una proteína vehicular heteróloga como una vacuna de alergia. Sin embargo, se ha mostrado que este péptido no induce la producción de anticuerpos que reaccionan con IgE nativa soluble. Además, Hellman (Patente U.S. No. 5.653.980) propuso composiciones de vacunas anti-IgE basadas en la fusión de los dominios CεH2-CεH3 de longitud completa (con una longitud de aproximadamente 220 aminoácidos) a una proteína vehicular extraña. Sin embargo, los anticuerpos inducidos por las composiciones de vacuna anti-IgE propuestas en Hellman resultarán lo más probablemente en anafilaxia ya que se ha mostrado que los anticuerpos frente a algunas partes de los dominios CεH2 y CεH3 de la molécula de IgE se entrecruzan con el receptor de IgE en la superficie de mastocitos y basófilos y dan lugar a la producción de mediadores de anafilaxis (Véase, por ejemplo, Stadler et al., 1993, Int. Arch. Allergy and Immunology 102:121-126). Por lo tanto, permanece una necesidad de tratamiento de reacciones alérgicas mediadas por IgE que no induzcan anticuerpos anafilácticos.

La preocupación significativa sobre la inducción de anafilaxis ha resultado en el desarrollo de otra estrategia para el tratamiento de trastornos alérgicos tipo I que consiste en mimotopos que podrían inducir la producción de anticuerpos policlonales anti-IgE cuando se administran a animales (Véase, por ejemplo, Rudolf, et al., 1998, Journal of Immunology 160:3315-3321). Kricek et al. (Publicación Internacional No. WO 97/31948) crió bibliotecas de péptidos expuestos en fagos con el anticuerpo monoclonal BSW17 para identificar mimotopos de péptidos que pudieran mimetizar la conformación de la unión del receptor de IgE. Estos mimotopos podrían presumiblemente usarse para inducir anticuerpos policlonales que reaccionan con IgE nativa libre, pero no con IgE unida a receptor así como bloquear la unión de IgE a su receptor. Kriek *et al.* describió mimotopos de péptidos que no son homólogos a ninguna parte de la molécula de IgE y son así diferentes de los péptidos descritos en la presente invención.

Como se pone de manifiesto por un sondeo de la técnica, permanece una necesidad de aumentar la eficacia terapéutica de los métodos actuales de tratamiento o prevención de trastornos tales como cáncer, enfermedad autoinmune, trastorno inflamatorio, o alergia. En particular, existe una necesidad de aumentar la función efectora, particularmente, el efecto citotóxico de los anticuerpos terapéuticos usados en el tratamiento del cáncer. El estado actual de la técnica también carece del tratamiento o prevención de trastornos alérgicos (por ejemplo, bien por terapia con anticuerpos o terapia con vacuna).

### 3. Resumen de la invención

Los dominios extracelulares de FcγRIIA y FcγRIIB son 95% idénticos y comparten así numerosos epítomos. Sin embargo, FcγRIIA y FcγRIIB presentan actividades muy diferentes. La diferencia fundamental es que el FcγRIIA inicia una señalización intracelular que da lugar a la activación celular tal como fagocitosis y estallido respiratorio, mientras el FcγRIIB inicia una señalización inhibitoria. A la vista de sus distintas actividades y el papel en la modulación de las respuestas inmunes, se necesitan anticuerpos tales que reconocen FcγRIIB nativo, y no FcγRIIA nativo. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de dichos anticuerpos específicos de FcγRIIB.

Como se especifica por las reivindicaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno de éste, en el que dicho anticuerpo aislado o dicho fragmento de unión a antígeno se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une a FcγRIIA humano nativo, y en el que:



i) dicho anticuerpo es anticuerpo 8B5.3.4 producido por una línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610; o

5 ii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; o

10 iii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende las seis CDR del anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, teniendo dichas seis CDR las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5-10, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo de FcγRIIB que el reconocido por el anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610 y compete con dicho anticuerpo 8B5.3.4 para la unión a FcγRIIB humano nativo, y en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno tiene una constante de disociación  $K_d$  ( $K_{disoc}/K_{asoc}$ ) de menos de  $5 \times 10^{-9}$  M según se determina por resonancia de plasmón superficial. Como se especifica por las reivindicaciones, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. La especificación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, más particularmente FcγRIIA humano nativo. Como se especifica por las reivindicaciones, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. En determinadas realizaciones de la invención que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, el anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIB con una afinidad al menos 2 veces mayor de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. En otras realizaciones de la invención que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, el anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIB con una afinidad al menos 4 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces, al menos  $10^4$ , al menos  $10^5$ , al menos  $10^6$ , al menos  $10^7$ , o al menos  $10^8$  veces mayor de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. En una realización preferida que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIB con una afinidad 100 veces, 1.000 veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces,  $10^6$  veces,  $10^7$  veces, ó  $10^8$  veces mayor de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. Preferiblemente, estas afinidades de unión se determinan con la IgG monomérica, y no la IgG agregada, y la unión es a través del dominio variable (por ejemplo, fragmentos Fab de los anticuerpos que tienen características de unión similares a la molécula de inmunoglobulina completa).

35 La invención se refiere, como se especifica por las reivindicaciones, a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, según se determina por cualquier método estándar conocido en la técnica para evaluar especificidades. La invención se refiere, como se especifica por las reivindicaciones, a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, según se determina, por ejemplo, por transferencia Western, BIAcore o radioinmunoensayo. La especificación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, según se determina en un ensayo ELISA, en el intervalo lineal para la unión a FcγRIIB. En un caso, la especificación se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB, producido en sistema de mamífero, con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, según se determina en un ensayo ELISA.

45 En un caso particular, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, y el dominio constante de dicho anticuerpo tiene además una afinidad aumentada para al menos uno o más receptores Fc de activación. En otro caso específico más, dicho receptor Fc de activación es FcγRIII.

50 En un caso, dicho anticuerpo o un fragmento de éste bloquea el sitio de unión a IgG de FcγRIIB y bloquea la unión de IgG marcadas agregadas a FcγRIIB, por ejemplo, en un ensayo ELISA de bloqueo. En un caso particular, dicho anticuerpo o un fragmento de éste bloquea la unión de IgG marcadas agregadas en un ensayo ELISA de bloqueo al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, ó 99,9%. En otro caso particular más, el anticuerpo o un fragmento de éste bloquea completamente la unión de dicha IgG marcada agregada en dicho ensayo ELISA.

55 En otro caso, dicho anticuerpo o un fragmento de éste bloquea el sitio de unión a IgG de FcγRIIB y bloquea la unión de IgG marcada agregada a FcγRIIB, según se determina por un ensayo FACS con doble tinción.

60 La especificación engloba el uso de anticuerpos que modulan (es decir, agonizan o antagonizan) la actividad de FcγRIIB. En un caso, los anticuerpos de la especificación agonizan al menos una actividad de FcγRIIB, es decir, incitan la señalización. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas de la especificación pueden mimetizar el agrupamiento de FcγRIIB dando lugar a una disminución en la respuesta activadora a la ligación de FcγR e inhibición de la capacidad de respuesta celular.

En otro caso, los anticuerpos de la especificación antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB, es decir, bloquean la señalización. Por ejemplo, los anticuerpos de la especificación bloquean la unión de IgG agregadas a FcγRIIB.

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

10 En un caso particular, los anticuerpos anti-FcγRIIB bloquean el sitio de unión a ligando de FcγRIIB. En un caso específico más, la actividad bloqueante puede bloquear la regulación negativa de la activación desencadenada por el complejo inmune y consecuentemente aumentar la respuesta inmune. En un caso más, la respuesta inmune aumentada es un incremento en la respuesta celular dependiente de anticuerpo. En otro caso, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la especificación bloquean el entrecruzamiento de los receptores FcγRIIB a receptores de células B y/o Fc, dando lugar a la activación de células B, mastocitos, células dendríticas, o macrófagos.

15 También se describen métodos para la producción de anticuerpos de la invención o fragmentos de éstos, particularmente para la producción de anticuerpos monoclonales ("MAB") nuevos con mayores especificidades para FcγRIIB respecto a FcγRIIA. Los anticuerpos de la invención o fragmentos de éstos pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la producción de anticuerpos, en particular, por secreción de células de hibridoma cultivadas, síntesis química o por técnicas de expresión recombinante conocidas en la técnica. Una se refiere a un método para producir recombinantemente un anticuerpo específico de FcγRIIB, comprendiendo dicho método: (i) cultivar bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo en un medio, una célula huésped que contiene una primera molécula de ácido nucleico, unida de forma operativa a un promotor heterólogo y un segundo ácido nucleico unido de forma operativa al mismo promotor heterólogo o uno diferente, codificando dicho primer ácido nucleico y segundo ácido nucleico una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA; y (ii) recuperar dicho anticuerpo de dicho medio. Otra es un método para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una mayor afinidad de la que dichos anticuerpos monoclonales se unen a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, comprendiendo dicho método: (a) inmunizar uno o más ratones transgénicos para FcγRIIA con FcγRIIB purificado o un fragmento inmunogénico de éste; (b) producir líneas celulares de hibridoma a partir de esplenocitos de dicho uno o más ratones; (c) cribar dichas líneas celulares de hibridoma para una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que los anticuerpos se unen a FcγRIIA. También se describe un método para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una mayor afinidad de la que dichos anticuerpos monoclonales se unen a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, comprendiendo dicho método: (a) inmunizar uno o más ratones transgénicos para FcγRIIA con FcγRIIB purificado o un fragmento inmunogénico de éste; (b) reforzar la inmunización de dichos ratones durante un tiempo suficiente para incitar una respuesta inmune; (c) producir líneas celulares de hibridoma a partir de esplenocitos de dicho uno o más ratones; (d) cribar dichas líneas celulares de hibridoma para una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que los anticuerpos se unen a FcγRIIA. Preferiblemente, se refuerza la inmunización de dichos ratones al menos cuatro veces durante un periodo de cuatro meses. Los ratones pueden inmunizarse con FcγRIIB purificado, que se ha mezclado con adyuvantes que se sabe en la técnica que aumentan la respuesta inmune en dichos ratones. El fragmento inmunogénico puede ser el dominio extracelular soluble de FcγRIIB. Las líneas celulares de hibridoma pueden cribarse usando técnicas estándar conocidas en la técnica (por ejemplo, ELISA).

45 En determinadas realizaciones de la invención que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, los anticuerpos anti-FcγRIIB son anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos multispecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos, o fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores.

50 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales, y más preferiblemente, anticuerpos humanizados o humanos. Como se especifica por las reivindicaciones, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. En determinados casos, los anticuerpos descritos en la presente memoria reconocen específicamente o selectivamente uno o más epítopos de FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano nativo. Se discute el uso de la tecnología de exposición en fagos para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la invención para FcγRIIB. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez incrementada para FcγRIIB (por ejemplo, ELISA). Los anticuerpos de la invención pueden cribarse usando ensayos de cribado de anticuerpos muy conocidos en la técnica (por ejemplo, ensayos BIACORE) para identificar anticuerpos con una velocidad  $K_{disoc}$  de menos de  $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

60 En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4, que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, o versiones quiméricas, humanizadas u otras preparadas por ingeniería de éste. En otro caso, la especificación proporciona un anticuerpo monoclonal producido por los

clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, o versiones quiméricas, humanizadas u otras preparadas por ingeniería de éste. En otra realización, la invención proporciona, como se especifica por las reivindicaciones, un anticuerpo aislado o un fragmento de éste que compite para la unión con el anticuerpo monoclonal producido por el clon 8B5.3.4 y se une a FcγRIIB humano nativo con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA humano nativo y se une al mismo epítipo de FcγRIIB que el anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 8B5.3.4 y se une a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. Además, la especificación proporciona las líneas celulares de hibridoma 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. En un caso específico, la especificación proporciona el uso de un anticuerpo 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2, o versiones quiméricas, humanizadas u otras preparadas por ingeniería de éste, para prevenir, tratar, gestionar o mejorar una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. En una realización particular que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, una versión preparada por ingeniería comprende una o más mutaciones en la región Fc. La una o más mutaciones en la región Fc pueden resultar en un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpo alterada, una unión alterada a otros receptores Fc (por ejemplo, receptores Fc de activación), una actividad ADCC alterada, o una actividad de unión a C1q alterada, o una actividad de citotoxicidad dependiente de complemento alterada, o cualquier combinación de éstas. En una realización preferida, un anticuerpo 8B5.3.4 humanizado comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En otra realización preferida el dominio Fc de la cadena pesada del anticuerpo 8B5.3.4 humanizado se prepara por ingeniería para comprender al menos una sustitución de aminoácido en la posición 240, 243, 247, 255, 270, 292, 300, 316, 370, 392, 396, 416, 419, ó 421 con otro aminoácido en esa posición. En una realización más preferida, el dominio Fc de la cadena pesada del anticuerpo 8B5.3.4 humanizado tiene una leucina en la posición 247, una lisina en la posición 421 y un ácido glutámico en la posición 270; una treonina en la posición 392, una leucina en la posición 396, y un ácido glutámico en la posición 270; o un ácido glutámico en la posición 270, un ácido aspártico en la posición 316, y una glicina en la posición 416. En determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo no es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4, o versiones quiméricas, humanizadas u otras preparadas por ingeniería de éste.

En determinadas realizaciones de la invención que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, se proporcionan anticuerpos 8B5.3.4 humanizados, comprendiendo dichos anticuerpos 8B5.3.4 humanizados un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que el dominio Fc de la cadena pesada del anticuerpo 8B5.3.4 humanizado tiene una leucina en la posición 247, una lisina en la posición 421 y un ácido glutámico en la posición 270; o un ácido glutámico en la posición 270, un ácido aspártico en la posición 316, y una glicina en la posición 416.

La especificación también engloba polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. En un caso, la especificación proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. La especificación también se refiere a un vector que comprende dicho ácido nucleico. La especificación proporciona además un vector que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, siendo dicha cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste que se une a FcγRIIA. En un caso específico, dicho vector es un vector de expresión. La especificación proporciona además células huésped que contienen los vectores de o polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. Preferiblemente, la especificación engloba polinucleótidos que codifican cadenas pesada y ligera de los anticuerpos producidos por el clon de hibridoma depositado 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, o partes de éste, por ejemplo, CDR, dominios variables, etc. y versiones humanizadas de éste.

Los receptores Fc activadores e inhibidores, por ejemplo, FcγRIIA y FcγRIIB, son críticos para la función equilibrada de estos receptores y las respuestas inmunes celulares apropiadas. La especificación engloba el uso de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de dicho equilibrio y control regulado de la ruta de señalización del receptor Fc. Así, los anticuerpos frente a FcγRIIB de la invención tienen usos en la regulación de la respuesta inmune, por ejemplo, en la inhibición de la respuesta inmune en conexión con enfermedades autoinmunes o inflamatorias, o respuestas alérgicas. Los anticuerpos frente a FcγRIIB de la invención también pueden usarse para alterar determinadas funciones efectoras para aumentar, por ejemplo, la citotoxicidad mediada por el anticuerpo terapéutico.

Los anticuerpos de la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, por ejemplo, en una realización, como terapia con un único agente. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de melanoma. Los anticuerpos también son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, particularmente para potenciar la actividad citotóxica de anticuerpos terapéuticos específicos de antígenos del

cáncer con actividad citotóxica para aumentar la muerte de las células tumorales y/o aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC"), citotoxicidad dependiente de complemento ("CDC"), o fagocitosis de los anticuerpos terapéuticos. Se describe un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento éste se une a FcγRIIA, y un segundo anticuerpo que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer y es citotóxico. También se proporciona un método para tratar cáncer en un paciente que tiene un cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano nativo con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento éste se une a FcγRIIA, preferiblemente FcγRIIA humano nativo, y el dominio constante del cual tiene además una afinidad incrementada para uno o más receptores Fc de activación, tales como FcγRIIA, cuando el anticuerpo es monomérico, y un anticuerpo que se une específicamente a dicho antígeno de cáncer y es citotóxico. Dicho receptor Fc de activación puede ser FcγRIIA. El anticuerpo de la invención puede administrarse a una dosis tal que el anticuerpo no se une de forma detectable a neutrófilos.

Los anticuerpos de la invención también son útiles para la prevención o tratamiento de malignidades de células B, particularmente linfoma no de Hodgkin o leucemia linfocítica crónica. De acuerdo con esto, se discuten métodos para tratar, gestionar, prevenir, o mejorar una malignidad de células B mediante la administración, bien solos o en combinación con uno o más terapéuticos adicionales, de anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB, y, preferiblemente, que no se unen específicamente a FcγRIIA, así como derivados, análogos y fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos. En casos particulares, el cáncer del sujeto es refractario a una o más terapias estándar o experimentales, particularmente, a tratamiento con Rituxan. Los métodos descritos pueden usarse para el tratamiento, gestión, prevención, o mejora de enfermedades de células B, tales como leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), linfoma no de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular con áreas de linfoma de células B grandes difuso, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, y linfoma de células escindidas pequeñas difuso.

El uso de un anticuerpo específico de FcγRIIB puede conjugarse con un agente o fármaco terapéutico. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden conjugarse con un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste incluyen, pero no están limitados a, citoquinas, toxinas, elementos radiactivos, y antimetabolitos.

El uso de un anticuerpo específico de FcγRIIB puede ser en combinación con un régimen de tratamiento estándar o experimental para malignidades de células B (por ejemplo, quimioterapia, radioinmunoterapia, o radioterapia). Dicha terapia de combinación puede aumentar la eficacia del tratamiento estándar o experimental. Los ejemplos de agentes terapéuticos que son particularmente útiles en combinación con un anticuerpo específico de FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, para la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de malignidades de células B, incluyen, pero no están limitados a, Rituxan, interferón-alfa, y agentes anti-cancerosos. Los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en combinación con un anticuerpo específico de FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, y hormonas. Las terapias de combinación permiten dosificaciones menores del anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste y/o la administración menos frecuente de anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste a un sujeto con una malignidad de células B, para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico.

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

También se describe un método para aumentar el efecto citotóxico mediado por un anticuerpo en un sujeto que se está tratando con un anticuerpo citotóxico, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente un anticuerpo de la invención o un fragmento de éste, en una cantidad suficiente para aumentar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. También se discute un método para aumentar un efecto citotóxico mediado por anticuerpo en un sujeto que se está tratando con un anticuerpo citotóxico, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente un anticuerpo de la invención o un fragmento de éste, que tiene además una afinidad aumentada por un receptor Fc de activación, cuando es monomérico, en una cantidad suficiente para aumentar el efecto citotóxico de dicho anticuerpo citotóxico. Se describe además un método que comprende además la administración de una o más terapias de cáncer adicionales.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier anticuerpo terapéutico que medie su efecto terapéutico a través de la muerte celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. Los anticuerpos de la invención pueden potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo mediante el aumento de la función efectora mediada por el anticuerpo. Los anticuerpos de la invención pueden potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo citotóxico mediante el aumento de la fagocitosis y opsonización de las células tumorales diana. Los anticuerpos de la invención pueden potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo mediante el aumento de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales diana. En determinadas circunstancias, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con proteínas de fusión de Fc para aumentar ADCC.

- 5 También se discute el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo terapéutico que no media su efecto terapéutico a través de la muerte celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. Se describe el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo terapéutico que induce apoptosis con actividad agonista, por ejemplo, anticuerpo anti-Fas. Los anticuerpos terapéuticos que inducen apoptosis pueden ser específicos para cualquier receptor de muerte conocido en la técnica para la modulación de la ruta apoptótica, por ejemplo, miembro de la familia de receptores TNFR o un miembro de la familia TRAIL.
- 10 Los anticuerpos de la invención pueden bloquear la progresión y metástasis de células tumorales mediadas por macrófagos. Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, donde ocurre la infiltración de macrófagos. Los anticuerpos antagonistas de la invención son particularmente útiles para controlar, por ejemplo, reducir o eliminar, la metástasis de las células tumorales, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que está localizada en el sitio tumoral. Los anticuerpos también pueden deplecionar o eliminar eficazmente células efectoras inmunes distintas de macrófagos que expresan FcγRIIB, por ejemplo, células dendríticas. La depleción o eliminación efectiva de células efectoras inmunes usando los anticuerpos de la invención puede variar de una reducción en la población de las células efectoras un 50%, 60%, 70%, 80%, preferiblemente 90%, y lo más preferiblemente 99%. El anticuerpo de la invención puede administrarse a una dosis tal que el anticuerpo no se une de forma detectable a neutrófilos.
- 15 Los anticuerpos agonistas de la invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma.
- 20 Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos terapéuticos que se unen inmunoespecíficamente a antígenos tumorales que no se expresan en las células en sí mismas, sino en las células no malignas, reactivas circundantes y que apoyan el tumor, que comprenden el estroma tumoral. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se usa en combinación con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno tumoral en una célula de fibroblasto, por ejemplo, la proteína de activación de fibroblastos (FAP).
- 25 Se discute un método para tratar un trastorno autoinmune en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos de la invención. También se discute un método para tratar un trastorno autoinmune en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes anti-inflamatorios, y/o uno o más agentes inmunomoduladores.
- 30 También se proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más anticuerpos de la invención. También se discute un método para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que lo necesita, comprendiendo dicho método además administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes anti-inflamatorios, y/o uno o más agentes inmunomoduladores.
- 35 También se proporciona un método para aumentar una respuesta inmune a una composición de vacuna en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o fragmento de éste se une a FcγRIIA, y una composición de vacuna, de manera que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se administra en una cantidad efectiva para aumentar la respuesta inmune a dicha composición de vacuna en dicho sujeto. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para aumentar una respuesta humoral y/o mediada por células frente al antígeno o antígenos de la composición de vacuna. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualesquiera vacunas conocidas en la técnica. Se discute el uso de los anticuerpos de la invención bien para prevenir o tratar un trastorno particular, donde una respuesta inmune aumentada frente a un antígeno o antígenos particulares es efectiva para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno.
- 40 También se discute un método para tratar o prevenir un trastorno alérgico mediado por IgE en un paciente que lo necesita, comprendiendo administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos agonistas de la invención. También se proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno alérgico mediado por IgE en un paciente que lo necesita, comprendiendo administrar a dicho paciente los anticuerpos de la invención en combinación con otros anticuerpos terapéuticos o composiciones de vacuna usados para el tratamiento o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE.
- 45 Se describe un método para aumentar la terapia inmune para un agente infeccioso en el que los anticuerpos de la invención se administran a un paciente que ya está infectado por un patógeno, tal como VIH, HCV o HSV, para aumentar la opsonización y fagocitosis de las células infectadas.
- 50 Se discute un método para tratar enfermedades con una señalización apoptótica alterada, por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmune. Esto puede incluir un método para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, comprendiendo dicho método administrar un anticuerpo de la invención en combinación con un anticuerpo anti-Fas.
- 55 Además se discute el uso de los anticuerpos de la invención para detectar la presencia de FcγRIIB específicamente (es decir, FcγRIIB y no FcγRIIA) en una muestra biológica.

También se describe un método de diagnóstico de una enfermedad autoinmune en un sujeto que comprende: (i) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención; y (ii) detectar la unión de dicho anticuerpo o un fragmento de éste, en el que la detección de dicho marcador detectable por encima de un fondo o nivel estándar indica que dicho sujeto tiene una enfermedad autoinmune.

- 5 La invención proporciona además, como se especifica por las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Determinadas realizaciones de la invención que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas proporcionan una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA; (ii) un anticuerpo citotóxico que se une específicamente a un antígeno de cáncer; y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En determinados casos, se describen composiciones farmacéuticas para uso según los métodos de la especificación, comprendiendo dichas composiciones farmacéuticas un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, en una cantidad efectiva para prevenir, tratar, gestionar, o mejorar una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan composiciones farmacéuticas para uso según los métodos de la especificación, comprendiendo dichas composiciones farmacéuticas un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste, un agente profiláctico o terapéutico distinto de un antagonista de FcγRIIB, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### 20 3.1 Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "se une específicamente a FcγRIIB" y términos análogos se refieren a anticuerpos o fragmentos de éstos (o cualesquiera otras moléculas que se unen a FcγRIIB) que se unen específicamente a FcγRIIB o un fragmento de éste y no se unen específicamente a otros receptores Fc, en particular a FcγRIIA. Además, un experto en la técnica entiende, que un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB, puede unirse a través del dominio variable o el dominio constante del anticuerpo. Si el anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB se une a través de su dominio variable, un experto en la técnica entiende que no está agregado, es decir, es monomérico. Un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos que se une específicamente a FcγRIIB o un fragmento de éste no reaccionan de manera cruzada con otros antígenos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a FcγRIIB pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Un anticuerpo o un fragmento de éste se une específicamente a un FcγRIIB cuando se une a FcγRIIB con mayor afinidad que a cualquier antígeno con reactividad cruzada según se determina usando técnicas experimentales, tales como transferencias Western, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Segunda Edición, Raven Press, Nueva York en las páginas 332-336 para una discusión respecto a la especificidad de los anticuerpos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "FcγRIIB nativo" se refiere a FcγRIIB que se expresa endógenamente y está presente en la superficie de una célula. En algunas realizaciones, "FcγRIIB nativo" engloba una proteína que se expresa recombinantemente en una célula de mamífero. Preferiblemente, el FcγRIIB nativo no se expresa en una célula bacteriana, es decir, E. coli. Lo más preferiblemente, el FcγRIIB nativo no está desnaturalizado, es decir, está en su conformación biológicamente activa.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "FcγRIIA nativo" se refiere a FcγRIIA que se expresa endógenamente y está presente en la superficie de una célula. En algunas realizaciones, "FcγRIIA nativo" engloba una proteína que se expresa recombinantemente en una célula de mamífero. Preferiblemente, el FcγRIIA nativo no se expresa en una célula bacteriana, es decir, E. coli. Lo más preferiblemente, el FcγRIIA nativo no está desnaturalizado, es decir, está en su conformación biológicamente activa.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "endógeno" en el contexto de una proteína celular se refiere a proteína natural y/o expresada por la célula en ausencia de manipulación recombinante; de acuerdo con esto, los términos "proteína expresada endógenamente" o "proteína endógena" excluye proteínas celulares expresadas por medio de tecnología recombinante.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "análogo" en el contexto de agentes proteínicos (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, y anticuerpos) se refiere a un agente proteínico que posee una función similar o idéntica a un segundo agente proteínico pero que no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica del segundo agente proteínico, o posee una estructura similar o idéntica del segundo agente proteínico. Un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos similar se refiere a un segundo agente proteínico que satisface al menos uno de los siguientes: (a) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos

95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un segundo agente proteínico; (b) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones astringentes con una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo agente proteínico de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20  
 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100  
 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos; y (c) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un segundo agente proteínico. Un agente proteínico con estructura similar a un segundo agente proteínico se refiere a un agente proteínico que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar al segundo agente proteínico. La estructura de un polipéptido puede determinarse por métodos conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitado a, secuenciación de péptidos, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear, difracción de electrones, y microscopía electrónica cristalográfica.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan entonces los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes de aminoácidos o nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos  
 20 secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones x 100%). En un caso, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitante, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el ajuste de parámetros del programa de nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el ajuste de parámetros del programa XBLAST, por ejemplo, para puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineamientos con huecos para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, el sitio de internet NCBI). Otro ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de probabilidad de mutaciones PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, sólo se cuentan típicamente las concordancias exactas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "análogo" en el contexto de un agente no proteínico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que posee una función similar o idéntica como una primera molécula orgánica o inorgánica y es estructuralmente similar a la primera molécula orgánica o inorgánica.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "antagonista" y "antagonistas" se refieren a cualquier proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, molécula grande, o molécula pequeña (menor de 10 kD) que bloquea, inhibe, reduce o neutraliza una función, actividad y/o expresión de otra molécula, tal como la de FcγRIIB. En varios casos, un antagonista reduce una función, actividad y/o expresión de otra molécula al menos un 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% respecto a un control tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "malignidades de células B" y "malignidad de células B" se refieren a cualquier trastorno linfoproliferativo de células B. Las malignidades de células B incluyen tumores con origen en células B. Las malignidades de células B incluyen, pero no están limitadas a, linfomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y no de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular con áreas de linfoma de células B grandes difuso, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, y linfoma de células escindidas pequeñas difuso.

A no ser que se indique otra cosa, cuando se hace referencia a anticuerpos (como se define de manera amplia en la presente memoria), referencia a dominios de anticuerpo y/o posiciones de aminoácidos en anticuerpos, o fragmentos de éstos, se hace según la definición y asignación de aminoácidos a cada dominio en Kabat et al, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5a Ed. Public Health Service (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia de aminoácidos consenso para cada subgrupo, y asignó un número de residuo a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es extensible a anticuerpos no incluidos en su compendio mediante el alineamiento del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. Este método para la asignación de números de residuos se ha convertido en estándar en el campo e identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluyendo variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo de ratón. Así, tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de anticuerpos humanizados, una referencia tal como "en la posición 297 de la región Fc" se refiere a la posición de aminoácido en una cadena de inmunoglobulina, región de una cadena de inmunoglobulina, o región de un polipéptido derivado de una cadena de inmunoglobulina, que corresponde a la posición 297 de la inmunoglobulina humana correspondiente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a un neoplasma o tumor que resulta del crecimiento anormal incontrolado de células. Tal y como se usa en la presente memoria, cáncer incluye explícitamente, leucemias y linfomas. El término "cáncer" se refiere a una enfermedad que implica células que tienen el potencial de metastatizar a sitios distales y presentar rasgos fenotípicos que se diferencian de los de las células no cancerosas, por ejemplo, formación de colonias en un sustrato tridimensional tal como agar blando o la formación de redes tubulares o matrices semejantes a redes en una preparación tridimensional de membrana de basamento o matriz extracelular. Las células no cancerosas no forman colonias en agar blando y forman estructuras claras semejantes a esferas en preparaciones tridimensionales de membrana de basamento o matriz extracelular. Las células cancerosas adquieren un conjunto de características de capacidades funcionales durante su desarrollo, no obstante a través de varios mecanismos. Dichas capacidades incluyen evasión de la apoptosis, auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, invasión/metástasis en tejidos, ausencia de límite en el potencial explicativo, y angiogénesis sostenida. El término "célula cancerosa" se pretende que englobe células cancerosas tanto pre-malignas como malignas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales vecinas y se disemina a sitios distantes. En otras realizaciones más, el cáncer está asociado con un antígeno de cáncer específico.

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

El término "derivado" tal y como se usa en la presente memoria en conjunción con FcγRIIB se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido FcγRIIB, un fragmento de un



5 polipéptido FcγRIIB, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido FcγRIIB, o un fragmento de anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido FcγRIIB, que se ha alterado por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones). En algunos casos, un derivado de anticuerpo o fragmento de éste comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más CDR. El derivado de anticuerpo puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión, o peor unión cuando se compara con un anticuerpo no derivado. En casos específicos, se han sustituido, delecionado o añadido uno, dos, tres, cuatro, o cinco residuos de aminoácidos de la CDR (es decir, mutado). El término "derivado" tal y como se usa en la presente memoria en conjunción con FcγRIIB también se refiere a un polipéptido FcγRIIB, un fragmento de un polipéptido FcγRIIB, un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido FcγRIIB, o un fragmento de anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un polipéptido FcγRIIB, que se ha modificado, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no como limitación, un polipéptido FcγRIIB, un fragmento de un polipéptido FcγRIIB, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Un derivado de un polipéptido FcγRIIB, un fragmento de un polipéptido FcγRIIB, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo puede modificarse por modificaciones químicas conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido FcγRIIB, un fragmento de un polipéptido FcγRIIB, un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. En una realización, un derivado de anticuerpo posee una función similar o idéntica al anticuerpo parental. En otra realización, un derivado de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo tiene una actividad alterada cuando se compara con un anticuerpo no alterado. Por ejemplo, un derivado de anticuerpo o fragmento de éste puede unirse a su epítipo más firmemente o ser más resistente a proteólisis.

25 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para hacer referencia a una afección en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmune" se usa indistintamente con el término "trastorno autoinmune" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por el daño celular, tisular y/u orgánico causado por una reacción inmunológica del sujeto frente a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con el término "trastorno inflamatorio" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden o no estar asociados con inflamación. Además, la inflamación puede o no estar causada por un trastorno autoinmune. Así, determinados trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunes como inflamatorios.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a una región en una molécula de antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una función del polipéptido. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de unión a epítipo.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (habitualmente de ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina el "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina el "aceptor". No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina con cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no englobaría un anticuerpo quimérico típico, porque, por ejemplo, la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es humana. Se dice que el anticuerpo donante se ha "humanizado", por el proceso de "humanización", porque el anticuerpo humanizado resultante se espera que se una al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos

humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas de las regiones hipervariables corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido FcγRIIB, que se ha alterado por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos (es decir, mutaciones). En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un derivado. Dicho anticuerpo humanizado comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más CDR no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente la misma unión, mejor unión, o peor unión cuando se compara con un anticuerpo humanizado no derivado. En casos específicos, se han sustituido, deleccionado o añadido uno, dos, tres, cuatro, o cinco residuos de aminoácidos de la CDR (es decir, mutado). Para detalles adicionales sobre la humanización de anticuerpos, véanse las Patentes Europeas Nos. EP 239.400, EP 592.106, y EP 519.596; Publicaciones Internacionales Nos. WO 91/09967 y WO 93/17105; Patentes U.S. Nos. 5.225.539, 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.766.886, y 6.407.213; y Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Sup):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Los residuos de CDR para Eph099B-208.261 y Eph099B-233.152 se listan en la Tabla 1. Los residuos de la "región marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se definen en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "agente inmunomodulador" y variaciones de éste, incluyendo, pero no limitado a, agentes inmunomoduladores, se refieren a un agente que modula el sistema inmune de un huésped. En determinadas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En determinadas otras realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no están limitados a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos, y moléculas orgánicas.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "gestiona," "que gestiona" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de la administración de un agente profiláctico o terapéutico, que no resulta en la cura de la enfermedad. En determinados casos, se administra a un sujeto uno o más agentes profilácticos o terapéuticos para "gestionar" una enfermedad de manera que se previene la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN y moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, 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 núcleos modificados que proporcionan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad incrementada de cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener partes tanto monocatenarias como bicatenarias, y pueden contener partes tricatenarias, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la aparición y/o recurrencia o inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resulta de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente o agentes que pueden usarse en la prevención de un trastorno, o prevención de recurrencia o diseminación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente efectiva puede referirse a la cantidad de agente

profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o diseminación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de ésta en un paciente, incluyendo pero no limitado a aquellos predispuestos a una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos predispuestos genéticamente a cáncer o que previamente se han expuesto a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente efectiva también puede referirse a la cantidad de agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de una enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente efectiva con respecto a un agente profiláctico de la especificación significa la cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de una enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de un anticuerpo frente a FcγRIIB de la invención, el término puede englobar una cantidad que mejora la profilaxis global o aumenta la eficacia profiláctica de o actúa de manera sinérgica con otro agente profiláctico, tal como pero no limitado a un anticuerpo terapéutico. En determinados casos, el término "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo específico de FcγRIIB agonista. En otros casos, el término "agente profiláctico" se refiere a un anticuerpo específico de FcγRIIB antagonista. En determinados otros casos, el término "agente profiláctico" se refiere a quimioterapéuticos de cáncer, terapia con radiación, terapia hormonal, terapia biológica (por ejemplo, inmunoterapia), y/o anticuerpos frente a FcγRIIB de la invención. En otros casos, puede administrarse más de un agente profiláctico en combinación.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "efectos secundarios" engloba efectos no deseados y adversos de un agente profiláctico o terapéutico. Los efectos adversos son siempre no deseados, pero los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso de un agente profiláctico o terapéutico podría ser dañino o molesto o presentar riesgo. Los efectos secundarios de la quimioterapia incluyen, pero no están limitados a, toxicidad gastrointestinal tal como, pero no limitado a, diarrea y flatulencia de formación temprana y tardía, náusea, vómito, anorexia, leucopenia, anemia, neutropenia, astenia, calambre abdominal, fiebre, dolor, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio, mareo, mucositis, xerostomía, y fallo renal, así como estreñimiento, efectos nerviosos y musculares, daño temporal o permanente en los riñones y vejiga, síntomas semejantes a gripe, retención de fluidos, e infertilidad temporal o permanente. Los efectos secundarios de la terapia con radiación incluyen pero no están limitados a fatiga, boca seca, y pérdida de apetito. Los efectos secundarios de las terapias biológicas/inmunoterapias incluyen pero no están limitados a enrojecimientos e hinchazones en el sitio de la administración, síntomas semejantes a la gripe tales como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas en el tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos secundarios de las terapias hormonales incluyen pero no están limitados a náusea, problemas de fertilidad, depresión, pérdida de apetito, problemas oculares, dolor de cabeza, fluctuación de peso. Los efectos no deseados adicionales experimentados típicamente por pacientes son numerosos y conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference (56a ed., 2002).

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "Fv de cadena única" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, p. 269-315 (1994). En realizaciones específicas que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, los scFv incluyen scFv biespecíficos y scFv humanizados.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Tal y como se usa en la presente memoria, un sujeto es preferiblemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), lo más preferiblemente un ser humano.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno asociado con FcγRIIB y cualquier enfermedad relacionada con la pérdida de regulación en la ruta de señalización del receptor Fc o para aumentar la eficacia terapéutica de otra terapia, por ejemplo, anticuerpo terapéutico, terapia con vacuna o profilaxis, etc. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar el inicio de una enfermedad, por ejemplo, retrasar o minimizar la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede referirse a la cantidad de agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente efectiva respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de una enfermedad, por ejemplo, suficiente para aumentar la eficacia terapéutica de un anticuerpo terapéutico suficiente para tratar o gestionar una enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de anticuerpo frente a FcγRIIB de la invención, el término puede englobar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita efectos no deseados, o aumenta la eficacia terapéutica de o actúa de forma sinérgica con otro agente terapéutico.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "tratar," "que trata" y "tratamiento" se refieren a la erradicación, reducción o mejora de síntomas de una enfermedad o trastornos relacionados con la pérdida de regulación en la ruta de señalización del receptor Fc o para aumentar la eficacia terapéutica de otra terapia, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, terapia con vacuna o profilaxis. En algunos casos, tratamiento se refiere a la erradicación, eliminación, modificación, o control de tejido canceroso primario, regional, o metastásico que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos. En determinados casos, dichos términos se refieren a

minimizar o retrasar la diseminación del cáncer que resulta de la administración de uno o más agentes terapéuticos a un sujeto con dicha enfermedad. En otros casos, dichos términos se refieren a la eliminación de células causantes de la enfermedad.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que los agentes profilácticos y/o terapéuticos se administran a un sujeto con un trastorno, por ejemplo, trastorno celular hiperproliferativo, especialmente cáncer. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 12 semanas antes), concomitantemente con, o posteriormente a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 12 semanas después) la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto que ha tenido, tiene, o es susceptible de tener un trastorno. Los agentes profilácticos o terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que el agente de la especificación puede actuar conjuntamente con el otro agente para proporcionar un beneficio incrementado respecto al que se obtendría si se administraran de otra manera. Puede administrarse cualquier agente profiláctico o terapéutico adicional en cualquier orden con los otros agentes profilácticos o terapéuticos adicionales.

#### 4. Descripción breve de los dibujos

20 **FIG. 1:** Inmunoreactividad del anticuerpo 8B5.3.4 frente a FcγRIIA y FcγRIIB. La unión directa del anticuerpo producido por el clon de la línea celular de hibridoma 8B5.3. (MAb 8B5.3.4) a FcγRIIB y FcγRIIA se ensayó (en duplicado) en un ensayo ELISA usando placas recubiertas con los receptores FcγRIIA y FcγRIIB. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con HRP, y la absorbancia se monitorizó a 650 nm.

25 **FIG. 2:** Caracterización de isotipo del MAb 8B5.3.4. El isotipo del MAb 8B5.3.4 producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 se determinó por ensayo ELISA. Se ensayaron anticuerpos frente a varios isotipos, y se reportan los valores de absorbancia.

**FIG. 3:** Se representan las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) y aminoácidos (SEQ ID NO: 3) para la cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal producido por el clon 8B5.3.4.

30 **FIG. 4:** Se representan las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) y aminoácidos (SEQ ID NO: 4) para la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal producido por el clon 8B5.3.4.

#### 5. Descripción de las realizaciones preferidas

##### 5.1 Anticuerpos específicos de FcγRIIB

35 Como se especifica por las reivindicaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno de éste, en el que dicho anticuerpo aislado o dicho fragmento de unión a antígeno se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une a FcγRIIA humano nativo, y en el que:

i) dicho anticuerpo es anticuerpo 8B5.3.4 producido por una línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610; o

40 ii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; o

45 iii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende las seis CDR del anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, teniendo dichas seis CDR la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5-10, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo de FcγRIIB que el reconocido por el anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610 y compite con dicho anticuerpo 8B5.3.4 para la unión a FcγRIIB humano nativo, y en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno tiene una constante de disociación  $K_d$  ( $K_{disoc}/K_{asoc}$ ) de menos de  $5 \times 10^{-9}$  M según se determina por resonancia de plasmón superficial. La presente especificación engloba anticuerpos (preferiblemente anticuerpos monoclonales) o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB, preferiblemente FcγRIIB humano, más preferiblemente FcγRIIB humano nativo con una mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, preferiblemente FcγRIIA humano, más preferiblemente FcγRIIA humano nativo. Los anticuerpos representativos se describen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0185045 y Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 50 2006/0013810. La presente especificación engloba el uso de un anticuerpo específico de FcγRIIB, un análogo, derivado o un fragmento de unión a antígeno de éste (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la

complementariedad ("CDR") de un anticuerpo específico de FcγRIIB) en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de una enfermedad, tal como cáncer, en particular, una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. Como se especifica por las reivindicaciones, los anticuerpos de la invención se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. En determinadas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, los anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIB con una afinidad mayor de dos veces, cuatro veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1.000 veces, 10<sup>4</sup> veces, 10<sup>5</sup> veces, 10<sup>6</sup> veces, 10<sup>7</sup> veces, ó 10<sup>8</sup> veces de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA. En otros casos más, la especificación engloba el uso de anticuerpos frente a FcγRIIB que se unen exclusivamente a FcγRIIB y no tienen afinidad para FcγRIIB usando métodos estándar conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. En una realización preferida, los anticuerpos son humanos o humanizados.

En un caso particular, los anticuerpos de la especificación, o fragmentos de éstos, agonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En un caso, dicha actividad es inhibición de la señalización mediada por el receptor de células B. En otro caso, los anticuerpos agonistas de la especificación inhiben la activación de las células B, proliferación de las células B, producción de anticuerpos, influjo de calcio intracelular de las células B, progresión del ciclo celular, o actividad de una o más moléculas de señalización aguas abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otro caso más, los anticuerpos agonistas de la especificación aumentan la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En un caso adicional, los anticuerpos agonistas inhiben la actividad de la MAP quinasa o reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de las células B. En otro caso, los anticuerpos agonistas de la especificación agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En un caso particular, dichos anticuerpos inhiben la activación de mastocitos inducida por FcεRI, movilización de calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otro caso, los anticuerpos agonistas de la especificación estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de los miembros de la familia MAP quinasa (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otro caso más, los anticuerpos agonistas de la especificación aumentan la fosforilación en tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otro caso, los anticuerpos agonistas de la especificación inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otro caso, los anticuerpos de la especificación, o fragmentos de éstos, antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En un caso, dicha actividad es activación de la señalización mediada por el receptor de células B. En un caso particular, los anticuerpos antagonistas de la especificación aumentan la actividad de las células B, proliferación de las células B, producción de anticuerpos, influjo de calcio intracelular, o actividad de una o más moléculas de señalización aguas abajo en la ruta de transducción de señales de FcγRIIB. En otro caso particular más, los anticuerpos antagonistas de la especificación disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En un caso adicional de la especificación, los anticuerpos antagonistas aumentan la actividad de la MAP quinasa o reclutamiento de Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de las células B. En otro caso, los anticuerpos antagonistas de la especificación antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI. En un caso particular, los anticuerpos antagonistas de la especificación aumentan la activación de mastocitos inducida por FcεRI, movilización de calcio, desgranulación, producción de citoquinas, o liberación de serotonina. En otro caso, los anticuerpos antagonistas de la especificación inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, aumentan la activación de los miembros de la familia MAP quinasa (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otro caso más, los anticuerpos antagonistas de la especificación inhiben la fosforilación en tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otro caso, los anticuerpos antagonistas de la especificación aumentan la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otro caso, los anticuerpos antagonistas de la especificación previenen la fagocitosis, aclaramiento de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

En otros casos, los anticuerpos de la especificación, o fragmentos de éstos pueden usarse para tomar como diana una población de células, pero no otras. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, los presentes inventores han descubierto que FcγRIIB no se expresa altamente en neutrófilos, como se pensaba previamente. Altas concentraciones de un anticuerpo anti-FcγRIIB reaccionan con neutrófilos. Sin embargo, la reactividad de los neutrófilos desaparece rápidamente con concentraciones decrecientes de anti-FcγRIIB. A bajas concentraciones de anticuerpo anti-FcγRIIB, se conservó la reactividad con células B CD20+. Así, la reactividad de un anticuerpo de la especificación con neutrófilos puede reducirse de manera que no afecta poblaciones irrelevantes, tales como neutrófilos o plaquetas. De acuerdo con esto, en determinados casos, se emplea un anticuerpo de la especificación a niveles que reconocen completamente sus poblaciones diana, pero no otras células.

Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos multispecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos camelizados, Fv de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por disulfuro (sdFv), intracuerpos, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos usados en los métodos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichas moléculas de inmunoglobulina se unen a FcγRIIA. Los análogos de anticuerpos también pueden incluir receptores de células T específicos de FcγRIIB, por ejemplo, receptores de células T quiméricos (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0043401), un

receptor de células T de cadena única unido a un anticuerpo de cadena única (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.534.633), y soportes proteicos (véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.818.418). En determinadas realizaciones, un análogo de anticuerpo de la invención no es un anticuerpo monoclonal.

5 Los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser de cualquier origen animal incluyendo pájaros y mamíferos (por ejemplo, humano, primate no humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, o pollo). Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Tal y como se usa en la presente memoria, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o bibliotecas de secuencias que codifican inmunoglobulinas humanas sintéticas o de ratones que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

10 Los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente memoria pueden ser mono-específicos, biespecíficos, triespecíficos o con una mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse inmuno-específicamente a diferentes epítomos de FcγRIIB o unirse inmuno-específicamente tanto a un epítomo de FcγRIIB así como a un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360, y WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Patentes U.S. Nos. 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, y 5.601.819; y Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Todorovska et al., 2001 Journal of Immunological Methods, 248:47-66.

15 En realizaciones particulares, los anticuerpos de la invención son multi-específicos con especificidades para FcγRIIB y para un antígeno de cáncer o cualquier otro marcador de la superficie celular específico para una célula (por ejemplo, una célula inmune tal como una célula T o una célula B) que se desea matar, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno particular, o para otros receptores Fc, por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIIB, etc.

20 En una realización particular, el anticuerpo se obtiene de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon de hibridoma, que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610. Los hibridomas que producen anticuerpos 8B5.3.4 se han depositado en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 23 de mayo de 2006 bajo las provisiones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimientos de Patente, y se les asignó el número de acceso PTA-7610 (para hibridoma que produce el anticuerpo 8B5.3.4). En una realización específica, la invención engloba un anticuerpo con la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son humanos o han sido humanizados, preferiblemente una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4.

25 La especificación también engloba el uso de otros anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB, preferiblemente FcγRIIB humano, más preferiblemente FcγRIIB humano nativo, que se obtienen de clones que incluyen pero no están limitados a 2B6 y 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los clones 2B6 y 3H7 se depositaron bajo las provisiones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002, y se incorporan en la presente memoria por referencia. Los hibridomas que producen los clones 1D5, 2E 1, 2H9, 2D 11, y 1F2 se depositaron bajo las provisiones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En realizaciones preferidas, los anticuerpos descritos anteriormente son quimerizados o humanizados.

35 Un anticuerpo particular usado en los métodos descritos es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferiblemente todas las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 8B5.3.4 con el número de acceso ATCC PTA-7610 (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). Un anticuerpo particular adicional usado en los métodos descritos es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferiblemente todas las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso ATCC , PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de éstos que comprenden menos de 6 CDR con alta afinidad y especificidad para un antígeno particular así como los métodos para producir e identificar dichos anticuerpos son conocidos comúnmente en la técnica (véase, por ejemplo, Ward et al., 1989, Nature 341:544-546; Dumoulin et al., 2002, Protein Sci. 11:500-515; Davies et al., 1995, Bio/Technol. 13:475-479; Van den Beucken et al., 2001, J. Mol. Biol. 310:591-601; y Pereira et al., 1998, Biochem. 37:1430-1437). Se han descrito anticuerpos específicos para un antígeno particular que se generaron combinando una o dos CDR de un anticuerpo que se sabe que se une específicamente al antígeno con otras CDR y se conocen comúnmente en la técnica (véase, por ejemplo, Marks et al., 1992, Bio/Technol. 10:779-783; Klimka et al., 2000, Brit. J. Cancer 83(2):252-260; y Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915). Así, la especificación contempla anticuerpos que tienen una, dos, tres, cuatro, o

cinco de las CDR del clon 8B5.3.4 que se unen a FcγRIIB específicamente y que pueden identificarse usando los métodos de cribado descritos en la presente memoria.

En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención es un polipéptido que comprende una o más CDR del anticuerpo producido por el clon 8B5.3.4 con número de acceso ATCC PTA-7610 (por ejemplo, la CDR3 de cadena pesada) que se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA humano nativo. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o cualquier combinación de éstas (véanse, por ejemplo, Davies et al., 1995, *Bio/Technol.* 13:475-479; Pereira et al., 1998, *Biochemistry* 37:1430-1437; Tsumoto et al., 2002, *FEBS Letters* 525:77-82; van den Beucken et al., 2001, *J. Mol. Biol.* 310:591-601; Ward et al.; 1989, *Nature* 341:544-546; y Dumoulin et al., 2002, *Protein Sci.* 11:500-515).

Un anticuerpo usado en los métodos descritos en la presente memoria puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4 con número de acceso ATCC PTA-7610, respectivamente y/o competir con el anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4 con número de acceso ATCC PTA-7610, respectivamente, según se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA. Un anticuerpo usado en los métodos descritos en la presente memoria puede unirse al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal de ratón producido por los clones de hibridoma 2B6, 3H7, 1 D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, y/o competir con el anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, y 1F2 que tienen los números de acceso ATCC, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, según se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA.

La presente especificación también engloba anticuerpos o fragmentos de éstos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. La presente especificación engloba además anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o fragmento de éste se une a FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por cualquier método conocido para un experto en la técnica, incluyendo búsquedas de proteínas BLAST.

La presente especificación también engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, en la que dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo están codificados por una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, en condiciones astringentes. En un caso preferido, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones astringentes con la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente, en condiciones astringentes. En otro caso preferido, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de éstos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos o fragmentos de éstos se unen a FcγRIIA, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones astringentes con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, o 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Las condiciones de hibridación astringentes incluyen, pero no están limitadas a, hibridación a ADN unido a filtro en disolución 6X de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/0,1% SDS a aproximadamente 50-65°C, condiciones altamente astringentes tales como hibridación a ADN unido a filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC/0,2% SDS a aproximadamente 60°C, o cualesquiera otras condiciones de hibridación astringentes conocidas para los expertos

en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

5 Los dominios constantes de los anticuerpos pueden seleccionarse respecto a la función propuesta del anticuerpo, en particular respecto a la función efectora que puede requerirse. En algunas realizaciones, los dominios constantes de los anticuerpos son dominios de IgA, IgE, IgG o IgM humanas.

10 Los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitado a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

15 Además, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotipo usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. (Véanse, por ejemplo, Greenspan y Bona, 1989, FASEB J. 7:437-444; y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147:2429-2438). La especificación proporciona métodos que emplean el uso de polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento de éste.

20 Los métodos descritos en la presente memoria también incluyen el uso de anticuerpos o fragmentos de éstos que tienen vidas medias (por ejemplo, vidas medias en suero) en un mamífero, preferiblemente un ser humano, de más de 15 días, preferiblemente más de 20 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses, o más de 5 meses. Las vidas medias incrementadas de los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de éstos en un mamífero, preferiblemente un ser humano, resultan en una titulación mayor en suero de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en el mamífero, y así, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y/o reduce la concentración que se tiene que administrar de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos o fragmentos de éstos que tienen vidas medias *in vivo* incrementadas pueden generarse por técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de éstos con vidas medias *in vivo* incrementadas pueden generarse modificando (por ejemplo, sustituyendo, delecionando o añadiendo) residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. Los anticuerpos de la invención pueden prepararse por ingeniería por métodos descritos en Ward et al. para incrementar las vidas medias biológicas (Véase la Patente U.S. No. 6.277.375 B1). Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden prepararse por ingeniería en el dominio bisagra de Fc para tener vidas medias en suero *in vivo* incrementadas.

35 Los anticuerpos o fragmentos de éstos con vidas medias *in vivo* incrementadas pueden generarse uniendo a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo moléculas de polímero tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). PEG puede unirse a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un conector multifuncional bien a través de conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o mediante grupos amino épsilon presentes en residuos de lisina. Se usará la derivatización con polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se monitorizará de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masa para asegurar una conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado puede separarse de los conjugados anticuerpo-PEG, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

45 Los anticuerpos de la invención también pueden modificarse por los métodos y agentes de acoplamiento descritos por Davis et al. (Véase la Patente U.S. No. 4.179.337) con el fin de proporcionar composiciones que puedan inyectarse en el sistema circulatorio de los mamíferos sustancialmente sin respuesta inmunogénica.

50 La presente especificación también engloba el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden las secuencias de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos de la invención con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos anticuerpos mantienen o aumentan la avidéz y/o afinidad de los anticuerpos para FcγRIIIb a los que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica (por ejemplo, inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo para un antígeno particular.

55 También se describen métodos para modificar una función efectora de un anticuerpo de la invención, en el que el método comprende modificar el contenido de carbohidrato del anticuerpo usando los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

Pueden usarse técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento de éste, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, que resulta en sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los



derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto al anticuerpo o fragmento de éste original. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas hechas en uno o más residuos de aminoácidos que se predice que no son esenciales.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también las Patentes U.S. Nos. 4.444.887 y 4,716.111; y las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

### 5.1.1 Anticuerpos humanizados

En realizaciones preferidas, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento de éste que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo específico de FcγRIIB humanizado puede comprender sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado de la invención también comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención pueden seleccionarse respecto a la función propuesta del anticuerpo, en particular la función efectora que puede requerirse. En algunas realizaciones, los dominios constantes de los anticuerpos humanizados de la invención son dominios de IgA, IgE, IgG o IgM humanas. En una realización específica que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, se usan los dominios constantes de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3, cuando los anticuerpos humanizados de la invención se pretenden para usos terapéuticos y se necesitan las funciones efectoras del anticuerpo. En realizaciones alternativas, se usan los isotipos IgG2 e IgG4 cuando el anticuerpo humanizado de la invención se pretende para propósitos terapéuticos y no se requiere la función efectora del anticuerpo. Los anticuerpos específicos de FcγRIIB humanizados se describen en las Solicitudes Provisionales U.S. con Nos. de Serie 60/569,882 y 60/582,043, presentadas el 10 de mayo de 2004 y el 21 de junio de 2004, respectivamente, y Solicitud de Patente U.S. No. 11/126.978, presentada el 10 de mayo de 2005.

En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene tanto la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. En otras realizaciones, el anticuerpo puede comprender además una o más de las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. En algunas realizaciones, el dominio constante es un dominio constante de fijación de complemento cuando se desea que el anticuerpo humanizado presente actividad citotóxica, y la clase es típicamente IgG<sub>1</sub>. En otras realizaciones, cuando no es deseable dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG<sub>2</sub>. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está en el alcance de la técnica.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no es necesario que se correspondan de manera precisa con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o el marco consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un residuo de manera que el residuo CDR o marco en ese sitio no se corresponde ni con el consenso ni anticuerpo donante. Dichas mutaciones, sin embargo, son preferiblemente no extensas. Habitualmente, al menos 75% de los residuos del anticuerpo humanizado se corresponderán con aquellos de las secuencias de región marco parental (FR) y CDR, más frecuentemente 90%, y lo más preferiblemente más del 95%. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo pero no limitado a, injerto de CDR (Patente Europea No. EP 239.400; Publicación Internacional No. WO 91/09967; y Patentes U.S. Nos. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (Patentes Europeas Nos. EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973), intercambio de cadenas (Patente U.S. No. 5.565.332), y técnicas descritas, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, Publicación Internacional No. WO 9317105, Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60, Morea et al., 2000, Methods 20:267-79, Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Sup):5973s-5977s, Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu, 1994, Gene 150:409-10, Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525, Riechmann et al., 1988, Nature 332:323, y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Frecuentemente, los residuos marco en las regiones marco se

sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de los residuos CDR y marco para identificar residuos marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos marco no habituales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., Patente U.S. No. 5.585.089; Publicaciones U.S. Nos. 2004/0049014 y 2003/0229208; Patentes U.S. Nos. 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann et al., 1988, Nature 332:323).

La presente especificación proporciona el uso de moléculas de anticuerpo humanizado específicas para FcγRIIB en las que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) se han sustituido por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donante que se une específicamente a FcγRIIB, con una afinidad mayor que FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 8B5.3.4, que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, respectivamente. En otro caso, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 8B5.3.4. En un caso lo más preferido, el anticuerpo humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo murino donante. Un experto en la técnica apreciará que la invención engloba injerto de CDR de anticuerpos en general. Así, los anticuerpos donante y aceptor pueden derivar de animales de la misma especie e incluso la misma clase o subclase de anticuerpo. Más habitualmente, sin embargo, los anticuerpos donante y aceptor derivan de animales de diferentes especies. Típicamente, el anticuerpo donante es un anticuerpo no humano, tal como un MAB de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunos casos, al menos una CDR del anticuerpo donante se injerta en el anticuerpo humano. En otros casos, al menos dos y preferiblemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de bucle estructural o una combinación de éstas. En algunos casos, la especificación engloba un anticuerpo frente a FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada injertada con CDR y al menos una cadena ligera injertada con CDR.

En una realización preferida, las regiones CDR del anticuerpo específico de FcγRIIB humanizado derivan de un anticuerpo murino específico para FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria comprenden alteraciones, incluyendo pero no limitado a deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, del anticuerpo aceptor, es decir, regiones marco de dominio variable humanas de cadena pesada y/o ligera que son necesarias para retener la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donante. En algunas realizaciones, las regiones marco de los anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región marco de una región variable de anticuerpo humano natural, sino que contiene varias alteraciones, incluyendo pero no limitado a deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específico para la misma diana que el anticuerpo específico de FcγRIIB murino. En las realizaciones más preferidas, se hace un número mínimo de alteraciones a la región marco con el fin de evitar introducciones a gran escala de residuos marco no humanos y para asegurar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los seres humanos. El anticuerpo monoclonal donante es preferiblemente un anticuerpo monoclonal producido por el clon 8B5.3.4 (que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610) que se une a FcγRIIB.

En un caso específico, la especificación engloba el uso de un anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en el que el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende residuos marco del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donante, que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 8B5.3.4. En otro caso específico, la especificación engloba el uso de un anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, en el que el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende residuos marco del anticuerpo receptor y residuos del anticuerpo monoclonal donante, que se une específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2.

Preferiblemente, los anticuerpos humanizados se unen al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. Los anticuerpos anti-FcγRIIB humanizados de la especificación pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 8) y/o CDR2 (SEQ ID NO: 9) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 10) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO: 5) y/o una CDR2 (SEQ ID NO: 6) y/o CDR3 (SEQ ID NO: 7).

En un caso específico, la especificación engloba el uso de un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo 8B5.3.4 en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. En particular, un anticuerpo con el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se usa en la prevención, tratamiento, gestión o mejora de una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. En otro caso preferido más, los anticuerpos humanizados no se unen además a receptores Fc de

activación, por ejemplo, FcγIIIA, FcγIIIB, *etc.*

En un caso específico, se proporciona un anticuerpo 8B5.3.4 humanizado, en el que la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH1-18 de línea germinal humana VH (Matsuda et al., 1998, J. Exp. Med. 188:2151062) y JH6 (Ravetch et al., 1981, Cell 27(3 Pt. 2): 583-91), y una o más regiones CDR VH del anticuerpo 8B5.3.4, que tienen la secuencia de aminoácidos de SED ID NO: 8, SED ID NO: 9, o SED ID NO: 10. En otro caso específico, el anticuerpo 8B5.3.4 humanizado comprende además una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VK-A26 de línea germinal humana VL (Lautner-Rieske et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) y JK4 (Hieter et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-22), y una o más CDR VL del anticuerpo 8B5.3.4, que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.

En particular, se proporciona un anticuerpo humanizado que se une inmunoespecíficamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo, comprendiendo dicho anticuerpo (o alternativamente, consistiendo en) secuencias CDR del anticuerpo 8B5.3.4, en cualquiera de las combinaciones siguientes: una CDR1 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; CDR2 de VH y CDR2 de VL; una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH y una CDR1 de VH; una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR2 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR2 de VH, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR1 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; una CDR2 de VH, una CDR3 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL; o cualquier combinación de éstas de las CDR de VH y CDR de VL descritas en la presente memoria.

### 5.1.2 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanos. Por ejemplo, pueden introducirse complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratones. Alternativamente, pueden introducirse la región variable, región constante, y región de diversidad humanas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales separadamente o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región J<sub>H</sub> previene la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan usando metodologías convencionales con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno pueden obtenerse a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos que portan los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B, y posteriormente experimentan conmutación de clase y mutación somática. Así, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión global de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las Patentes U.S. Nos. 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, y 5.939.598. Además, se puede encargar a empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) el suministro de anticuerpos humanos dirigidos frente a un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

### 5.1.3 Anticuerpos quiméricos

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina tales como anticuerpos que tienen una región variable derivadas de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. La presente especificación proporciona anticuerpos quiméricos

derivados de anticuerpos producidos a partir de los clones de hibridoma 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; y las Patentes U.S. Nos. 6.311.415, 5.807,715, 4.816,567, y 4.816.397. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una o más CDR de una especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; Publicación Internacional No. WO 91/09967; y Patentes U.S. Nos. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), recubrimiento o modificación en superficie (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; y Roguska et al., 1994, PNAS 91:969), e intercambio de cadenas (Patente U.S. No. 5.565.332).

Frecuentemente, los residuos marco en las regiones marco se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones marco se identifican por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de los residuos CDR y marco para identificar residuos marco importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos marco no habituales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature 332:323).

#### 5.1.4 Modificaciones en la región Fc

La invención engloba anticuerpos con dominios constantes Fc que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que alteran las funciones efectoras del anticuerpo tales como los descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente U.S. Nos. U.S. 2005/0037000 y U.S. 2005/0064514; Patentes U.S. Nos. 5.624.821 y 5.648.260 y Patente Europea No. EP 0 307 434. Estos anticuerpos pueden presentar actividad ADCC mejorada (es decir, 2 veces, 10 veces, 100 veces, 500 veces, etc.) compara con anticuerpos comparables sin modificación de aminoácidos.

La presente invención engloba anticuerpos que comprenden modificaciones, preferiblemente en la región Fc, que modifican la afinidad de unión del anticuerpo a uno o más FcγR. Los métodos para modificar anticuerpos con unión modificada para uno o más FcγR se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT Nos. WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089, y Patentes U.S. Nos. 5.843.597 y 5.642.821. En algunas realizaciones, la invención engloba anticuerpos que tienen afinidad alterada para un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIIIA. Preferiblemente, dichas modificaciones también tienen una función efectora mediada por Fc alterada. Las modificaciones que afectan la función efectora mediada por Fc son conocidas en la técnica (Véase, la Patente U.S. No. 6.194.551). Los aminoácidos que pueden modificarse según el método de la especificación incluyen pero no están limitados a Prolina 329, Prolina 331, y Lisina 322. Prolina 329, Prolina 331 y Lisina 322 se reemplazan preferiblemente con alanina, sin embargo, se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido. Véase la Publicación Internacional No. WO 00/42072 y la Patente U.S. No. 6.194.551.

En una realización particular, la modificación de la región Fc comprende una o más mutaciones en la región Fc. La una o más mutaciones en la región Fc pueden resultar en un anticuerpo con una función efectora mediada por anticuerpo alterada, una unión alterada a otros receptores Fc (por ejemplo, receptores Fc de activación), una actividad ADCC alterada, o una actividad de unión a C1q alterada, o una actividad citotóxica dependiente de complemento alterada, o cualquier combinación de éstas.

En algunas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la invención engloba moléculas que comprenden una región Fc variante que tiene una modificación de aminoácidos en una o más de las posiciones siguientes: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 229, 231, 232, 233, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 295, 298, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446, ó 447. Preferiblemente, la preparación por ingeniería de la parte Fc resulta en la muerte mediada por células incrementada y/o muerte mediada por complemento incrementada de las células tumorales.

La invención engloba moléculas, que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, que comprenden regiones Fc variantes que consisten en o comprenden cualquiera de las mutaciones listadas en la tabla siguiente en la Tabla 2.

Tabla 2. Mutaciones ejemplares

Mutantes de único sitio	Mutantes de doble sitio
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S166N
A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S
T366S	R255L, E318K
V379L	F243L, E318K
K288N	V279L, P395S
A330S	K246T, Y319F
F243L	F243I, V379L
E318K	K288M, K334E
V379M	K334E, E308D
S219Y	E233D, K334E
V282M	K246T, P396H
D401V	H268D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
1377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R
K326E	R255Q, K326E

ES 2 599 319 T3

Mutantes de único sitio	Mutantes de doble sitio
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q
S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-Delecionado
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
	P247L, L406F
	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K326I, P396L
	H268D, P396L

ES 2 599 319 T3

Mutantes de único sitio	Mutantes de doble sitio
	K210M, P396L
	L358P, P396L
	K334N, P396L
	V379M, P396L
	P227S, P396L
	P217S, P396L
	Q419H, P396L
	K370E, P396L
	L242F, P396L
	R255L, P396L
	V240A, P396L
	T250A, P396L
	P247S, P396L
	L410H, P396L
	Q419L, P396L
	V427A, P396L
	E258D, P396L
	N384K, P396L
	V323I, P396L
	P244H, P396L
	V305L, P396L
	S400F, P396L
	V303I, P396L
	A330V, Q419H
	V263Q, E272D
	K326E, A330T

5 En otras realizaciones más, que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la invención engloba moléculas que comprenden regiones Fc variantes que tienen más de dos modificaciones de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de dichas variantes se lista en la tabla siguiente (Tabla 3). La invención engloba mutaciones listadas en la Tabla 3 que comprenden además una o más modificaciones de aminoácidos tales como las descritas en la presente memoria.

**Tabla 3. Variantes de combinación ejemplares**

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H268L, A141V
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205E, F149Y, K133M
S408I, V215I, V125L
G385E, P247H
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T
H310Y, T289A, Y407V, E258D
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M
F243L, R255L, E318K
K334E, T359N, T366S
T256S, V305I, K334E, N390S
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L
K334E, T359N, T366S, Q386R
K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M
P217S, A378V, S408R
P247L, I253N, K334N
D312E, K327N, 1378S
D280E, S354F, A431D, L441I
K218R, G281D, G385R
P247L, A330T, S440G
T355N, P387S, H435Q



## ES 2 599 319 T3

P247L, A431V, S442F
P343S,P353L,S375I,S383N
E216D,E345K,S375I
K288N, A330S, P396L
K222N,T335N,K370E,A378V,T394M
G316D,A378V,D399E
N315I,V379M,T394M
K326Q,K334E,T359N,T366S
A378V,N390I,V422I
V282E,V369I,L406F
V397M,T411A,S415N
T223I,T256S,L406F
L235P,V382M,S304G,V305J,V323I
P247L,W313R,E388G
D221Y,M252I,A330G,A339T,T359N,V422I,H433L
F243I,V379L,G420V
A231V,Q386H,V412M
T215P,K274N,A287G,K334N,L365V,P396L
P244A,K326I,C367R,S375I,K447T
R301H, K340E,D399E
C229Y,A287T,V379M,P396L,L443V
E269K,K290N,Q311R,H433Y
E216D,K334R,S375I
T335N,P387S,H435Q
K246I,Q362H,K370E
K334E,E380D,G446V
V303I,V369F,M428L

## ES 2 599 319 T3

K246E,V284M,V308A
E293V,Q295E,A327T
Y319F,P352L,P396L
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D
K290T, N390I, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K261N, K210M, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
A330V, H433Q, V427M
V263Q, E272D, Q419H
N276Y, T393N, W417R
V282L, A330V, H433Y, T436R
V284M, S298N, K334E, R355W
A330V, G427M, K438R
S219T, T225K, D270E, K360R
K222E, V263Q, S298N
E233G, P247S, L306P
S219T, T225K, D270E

S254T, A330V, N361D, P243L
V284M, S298N, K334E, R355W R416T
D270E,G316D,R416G
K392T, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
P247L, N421K, D270E
R292P, V305I
R292P, V305I, F243L
V284M, R292L, K370N
F243L, R292L, Y300L

En las realizaciones más preferidas que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención tiene una región Fc modificada con afinidad alterada para receptores activadores y/o inhibidores, en el que el dominio Fc tiene una o más modificaciones de aminoácidos, en el que dichas una o más modificaciones de aminoácidos es una sustitución en la posición 288 con asparagina, en la posición 330 con serina y en la posición 396 con leucina (MgFc10) (véanse, las Tablas 2 y 3); o una sustitución en la posición 334 con ácido glutámico, en la posición 359 con asparagina, y en la posición 366 con serina (MgFc13); o una sustitución en la posición 316 con ácido aspártico, en la posición 378 con valina, y en la posición 399 con ácido glutámico (MgFc27); o una sustitución en la posición 392 con treonina, y en la posición 396 con leucina (MgFc38); o una sustitución en la posición 221 con ácido glutámico, en la posición 270 con ácido glutámico, en la posición 308 con alanina, en la posición 311 con histidina, en la posición 396 con leucina, y en la posición 402 con ácido aspártico (MgFc42); o una sustitución en la posición 240 con alanina, y en la posición 396 con leucina (MgFc52); o una sustitución en la posición 410 con histidina, y en la posición 396 con leucina (MgFc53); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, en la posición 378 con ácido aspártico, en la posición 404 con serina, y en la posición 396 con leucina (MgFc54); o una sustitución en la posición 255 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc55); o una sustitución en la posición 370 con ácido glutámico y en la posición 396 con leucina (MgFc59); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, en la posición 305 con isoleucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, en la posición 300 con leucina, y en la posición 396 con leucina (MgFc88A); o una sustitución en la posición 243 con leucina, en la posición 292 con prolina, y en la posición 300 con leucina (MgFc155). (Véanse, también, las Tablas 2, 3A y 3B de la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0064514 A1, de Stavenhagen et al., presentada el 28 de julio, 2004).

En una realización preferida, el anticuerpo anti-FcγRIIB, tal como el anticuerpo 8B5.3.4, tiene una región Fc modificada con una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305 y una leucina en la posición 396.

En realizaciones específicas que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la región Fc variante tiene una leucina en la posición 247, una lisina en la posición 421 y un ácido glutámico en la posición 270 (MgFc31/60); una treonina en la posición 392, una leucina en la posición 396, y un ácido glutámico en la posición 270 (MgFc38/60); una treonina en la posición 392, una leucina en la posición 396, un ácido glutámico en la posición 270, y una leucina en la posición 243 (MgFc38/60/F243L); una histidina en la posición 419, una leucina en la posición 396, y un ácido glutámico en la posición 270 (MgFc51/60); una histidina en la posición 419, una leucina en la posición 396, un ácido glutámico en la posición 270, y una leucina en la posición 243 (MgFc51/60/F243L); una

lisina en la posición 255, una leucina en la posición 396, y un ácido glutámico en la posición 270 (MGFc55/60); una lisina en la posición 255, una leucina en la posición 396, un ácido glutámico en la posición 270, y una lisina en la posición 300 (MGFc55/60/Y300L); una lisina en la posición 255, una leucina en la posición 396, un ácido glutámico en la posición 270, y una leucina en la posición 243 (MGFc55/60/F243L); un ácido glutámico en la posición 370, una leucina en la posición 396, y un ácido glutámico en la posición 270 (MGFc59/60); un ácido glutámico en la posición 270, un ácido aspártico en la posición 316, y una glicina en la posición 416 (MgFc71); una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396 (MGFc74/P396L); una glutamina en la posición 297, o cualquier combinación de las sustituciones individuales.

### 5.1.5 Modificaciones de carbohidrato

La invención también proporciona anticuerpos con un contenido de oligosacárido alterado. Oligosacáridos tal y como se usa en la presente memoria se refiere a carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples y los dos términos pueden usarse indistintamente en la presente memoria. Los restos de carbohidrato de la presente invención se describirán con referencia a la nomenclatura usada comúnmente en la técnica. Para una revisión de la química de carbohidratos, véase, por ejemplo, Hubbard et al., 1981 *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man que representa manosa; GlcNAc que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa y Glc para glucosa. Los ácidos siálicos se describen por la notación abreviada NeuNAc para ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para 5-glicolneuramínico.

En general, los anticuerpos contienen restos de carbohidratos en posiciones conservadas en la región constante de la cadena pesada, y hasta el 30% de las IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. IgG tiene una estructura de carbohidrato biantena ligada a N en Asn 297 que reside en el dominio CH2 (Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59-76; Wright et al., 1997, *Trends Biotech* 15: 26-32). La IgG humana tiene típicamente un carbohidrato de la estructura siguiente; GlcNAc(Fucosa)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)<sub>2</sub>. Sin embargo, se producen variaciones entre las IgG respecto al contenido de carbohidratos lo que da lugar a función alterada, véase, por ejemplo, Jassal et al., 2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 243-9; Groenink et al., 1996 *J. Immunol.* 26: 1404-7; Boyd et al., 1995 *Mol. Immunol.* 32: 1311-8; Kumpel et al., 1994, *Human Antibody Hybridomas*, 5: 143-51. La invención engloba anticuerpos que comprenden una variación en el resto de carbohidrato que está unido a Asn 297. En una realización que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, el resto de carbohidrato tiene una galactosa y/o galactosa-ácido siálico en una o ambas de las GlcNAc terminales y/o un tercer brazo GlcNAc (GlcNAc bisecada).

En algunas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, los anticuerpos de la invención carecen sustancialmente de uno o más grupos azúcar seleccionados, por ejemplo, uno o más residuos de ácido siálico, uno o más residuos de galactosa, uno o más residuos de fucosa. Un anticuerpo que carece sustancialmente de uno o más grupos azúcar seleccionados puede prepararse usando métodos comunes conocidos para un experto en la técnica, incluyendo por ejemplo la producción recombinante de un anticuerpo de la invención en una célula huésped que es defectuosa en la adición del o de los grupos azúcar seleccionados al resto de carbohidrato del anticuerpo, de manera que aproximadamente el 90-100% del anticuerpo en la composición no presente el o los grupos azúcar seleccionados unidos al resto de carbohidrato. Los métodos alternativos para preparar dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, cultivar células en condiciones que eviten o reduzcan la adición de uno o más grupos azúcar seleccionados, o la eliminación posterior a la traducción de uno o más grupos azúcar seleccionados.

En un caso específico, la especificación engloba un método para producir una preparación de anticuerpo sustancialmente homogénea, en la que aproximadamente el 80-100% del anticuerpo en la composición carece de una fucosa en su resto carbohidrato, por ejemplo, la unión de carbohidrato en Asn 297. El anticuerpo puede prepararse, por ejemplo, por (a) el uso de una célula huésped preparada por ingeniería que es defectuosa en el metabolismo de la fucosa de manera que tiene una capacidad reducida para fucosilar proteínas expresadas en ellas; (b) el cultivo de células en condiciones que eviten o reduzcan la fucosilación; (c) la eliminación posterior a la traducción de fucosa, por ejemplo, con una enzima fucosidasa; o (d) la purificación del anticuerpo de manera que se seleccione el producto que no está fucosilado. Lo más preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado se expresa en una célula huésped que tiene una capacidad reducida para fucosilar el anticuerpo expresado en ella. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) defectuosa en dihidrofolato reductasa, por ejemplo, una célula Lec 13 CHO (línea celular CHO mutante resistente a lectina; Ribka y Stanley, 1986, *Somatic Cell & Molec. Gen.* 12(1): 51-62; Ripka et al., 1986 *Arch. Biochem. Biophys.* 249(2): 533-45), CHO-K1, DUX-B11, CHO-DP12 o CHO-DG44, que se ha modificado de manera que el anticuerpo no se fucosila sustancialmente. Así, la célula puede presentar una expresión y/o actividad alterada de la enzima fucosiltransferasa, u otra enzima o sustrato implicado en la adición de fucosa al oligosacárido ligado a N de manera que la enzima tiene una actividad disminuida y/o nivel reducido de expresión en la célula. Para los métodos para producir anticuerpos con contenido de fucosa alterado, véase, por ejemplo, WO 03/035835 y Shields et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-40.

En algunas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, las modificaciones de carbohidratos alterados modulan uno o más de lo siguiente: solubilización del anticuerpo, facilitación del transporte subcelular y secreción del anticuerpo, estimulación del ensamblaje del anticuerpo, integridad conformacional, y función efectora mediada por anticuerpo. En una realización específica, las modificaciones de

carbohidrato alterado aumentan la función efectora mediada por anticuerpo respecto al anticuerpo que carece de la modificación de carbohidrato. Las modificaciones de carbohidrato que dan lugar a función efectora mediada por anticuerpo alterada son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, véase, Shields R.L. et al., 2001, J. Biol. Chem. 277(30): 26733-40; Davies J. et al., 2001, Biotechnology & Bioengineering, 74(4): 288-294). En otra realización específica, las modificaciones de carbohidrato alterado aumentan la unión de los anticuerpos de la invención al receptor FcγRIIB. Las modificaciones de carbohidrato alterado según los métodos de la especificación incluyen, por ejemplo, incrementar el contenido de carbohidrato del anticuerpo o disminuir el contenido de carbohidrato del anticuerpo. Los métodos para alterar los contenidos de carbohidrato son conocidos para los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, Wallick et al., 1988, Journal of Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao et al., 1989 Journal of Immunology, 143(8): 2595-2601; Routledge et al., 1995 Transplantation, 60(8): 847-53; Elliott et al. 2003; Nature Biotechnology, 21: 414-21; Shields et al. 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(30): 26733-40.

En algunas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la invención engloba anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glicosilación, de manera que uno o más restos de carbohidrato se unen covalentemente al anticuerpo. En otras realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la invención engloba anticuerpos que comprenden uno o más sitios de glicosilación y una o más modificaciones en la región Fc, de tales como las descritas supra y las conocidas para un experto en la técnica. En realizaciones preferidas que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la una o más modificaciones en la región Fc aumentan la afinidad del anticuerpo para un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIIIA, respecto al anticuerpo que comprende las regiones Fc de tipo salvaje. Los anticuerpos de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la región Fc tienen una función efectora mediada por anticuerpo aumentada, por ejemplo, actividad ADCC aumentada. En algunas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la invención comprende además anticuerpos que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe que directamente o indirectamente interactúan con un resto de carbohidrato del anticuerpo, incluyendo pero no limitado a los aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, y 301. Los aminoácidos que interactúan directamente o indirectamente con un resto de carbohidrato de un anticuerpo se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

La invención engloba anticuerpos que se han modificado mediante la introducción de uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de los anticuerpos, preferiblemente sin alterar la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo, la actividad de unión a FcγRIIB. Los sitios de glicosilación pueden introducirse en la región variable y/o constante de los anticuerpos de la invención. Tal y como se usa en la presente memoria, "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácido específica en un anticuerpo a la que se unirá un oligosacárido (es decir, carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos entre sí) específicamente y covalentemente. Las cadenas laterales de oligosacáridos están unidas típicamente al núcleo de un anticuerpo mediante uniones N u O. La glicosilación ligada a N se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de un resto de oligosacárido a un ácido hidroxiamino, por ejemplo, serina, treonina. Los anticuerpos de la invención pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluyendo sitios de glicosilación ligados a N y ligados a O. Cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación ligada a N o ligada a O conocido en la técnica puede usarse según la presente invención. Un sitio de glicosilación ligado a N ejemplar que es útil según los métodos de la presente invención, es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en la que X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Dicho sitio o sitios pueden introducirse en un anticuerpo de la invención usando métodos muy conocidos en la técnica a la que pertenece esta invención. Véase, por ejemplo, "In vitro Mutagenesis," Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1983, capítulo 8, p. 106-116. Un método ejemplar para introducir un sitio de glicosilación en un anticuerpo de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que se obtiene la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

Los métodos para modificar el contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención mediante la adición o delección de un sitio de glicosilación se describen así como lo son los métodos para modificar el contenido de carbohidrato de anticuerpos que son muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.218.149; EP 0 359 096 B1; Publicación U.S. No. US 2002/0028486; WO 03/035835; Publicación U.S. No. 2003/0115614; Patente U.S. No. 6.218.149; Patente U.S. No. 6.472.511. También se incluyen métodos para modificar el contenido de carbohidrato de un anticuerpo de la invención mediante la delección de uno o más restos de carbohidrato endógenos del anticuerpo.

También se proporciona el uso de anticuerpos FcγRIIB modificados en los que el sitio consenso de N-glicosilación Asn<sub>50</sub>-Val-Ser de la región CDR2 se ha modificado, de manera que se elimina el sitio de glicosilación en la posición 50. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, la eliminación del sitio de glicosilación puede limitar la variación potencial en la producción del anticuerpo así como la inmunogenicidad potencial en una aplicación farmacéutica. En una realización específica, la invención engloba el uso de un anticuerpo FcγRIIB humanizado en el que el aminoácido en la posición 50 se ha modificado, por ejemplo, delecionado o sustituido. En otro caso específico, la especificación engloba además el uso de un anticuerpo con una modificación de aminoácido, por ejemplo, delección o sustitución, en la posición 51. En un caso específico, la especificación engloba el uso de un anticuerpo FcγRIIB humanizado en el que el aminoácido en la posición 50 se ha reemplazado con tirosina. En otro caso más específico, la especificación engloba el uso de un anticuerpo FcγRIIB en

el que el aminoácido en la posición 50 se ha reemplazado con tirosina y el aminoácido en la posición 51 se ha reemplazado con alanina.

### 5.1.6 Agonistas y antagonistas de FcγRIIB

5 Además del uso de anticuerpo específico de FcγRIIB, un análogo, derivado, o un fragmento de unión a antígeno de éste en los métodos descritos y las composiciones de la invención, pueden usarse otros agonistas y antagonistas de FcγRIIB según los métodos descritos. Los agonistas y antagonistas de FcγRIIB incluyen, pero no están limitados a, moléculas proteínicas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos FcγRIIB solubles), péptidos, proteínas de fusión (por ejemplo, polipéptidos FcγRIIB solubles conjugados con un resto terapéutico), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido FcγRIIB, hélices triples, dsARN que media  
10 ARNi, o moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas proteínicas), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas pequeñas, fármacos, y moléculas inorgánicas pequeñas que bloquean, inhiben, reducen o neutralizan una función, una actividad y/o la expresión de un polipéptido FcγRIIB, expresado por una célula inmune, preferiblemente una célula B. En algunos casos, un agonista o antagonista de FcγRIIB usado según los métodos de la especificación no es una molécula orgánica pequeña, un fármaco o una molécula antisentido. Los  
15 agonistas y antagonistas de FcγRIIB pueden identificarse usando técnicas muy conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria.

Los compuestos profilácticos y terapéuticos de la invención incluyen, pero no están limitados a, moléculas proteínicas, incluyendo, pero no limitado a, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluyendo proteínas modificadas después de la traducción, anticuerpos, etc.; moléculas pequeñas (menos de 1.000 daltons), compuestos inorgánicos  
20 u orgánicos; moléculas de ácido nucleico incluyendo, pero no limitado a, ADN bicatenario o monocatenario, ARN bicatenario o monocatenario, así como moléculas de ácido nucleico de triple hélice. Los compuestos profilácticos y terapéuticos pueden derivar de cualquier organismo conocido (incluyendo, pero no limitado a, animales, plantas, bacterias, hongos, y protista, o virus) o de una biblioteca de moléculas sintéticas.

En determinados casos, los antagonistas de FcγRIIB reducen una función, actividad, y/o expresión de un polipéptido FcγRIIB en un sujeto con una malignidad de células B. En otros casos, los antagonistas de FcγRIIB se unen a un polipéptido FcγRIIB y modulan directamente o indirectamente una actividad y/o función de los linfocitos B. En casos  
25 particulares, los antagonistas de FcγRIIB inhiben o reducen la proliferación de células B en un sujeto con una malignidad de células B según se determina por ensayos estándar *in vivo* y/o *in vitro* descritos en la presente memoria o muy conocidos para los expertos en la técnica. En un caso específico, los antagonistas de FcγRIIB median la depleción de linfocitos, en particular células B de sangre periférica, en un sujeto con una malignidad de células B según se determina por ensayos estándar *in vivo* y/o *in vitro* descritos en la presente memoria o muy  
30 conocidos para los expertos en la técnica. En otro caso, los antagonistas de FcγRIIB modulan directamente o indirectamente una actividad y/o función de los linfocitos B mediante la utilización de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

35 En un caso preferido, las proteínas, polipéptidos o péptidos (incluyendo anticuerpos y proteínas de fusión) que se utilizan como antagonistas de FcγRIIB derivan de la misma especie que el receptor de las proteínas, polipéptidos o péptidos de manera que se reduce la probabilidad de una respuesta inmune frente a estas proteínas, polipéptidos o péptidos. En otro caso preferido, cuando el sujeto es un ser humano, las proteínas, polipéptidos, o péptidos que se utilizan como antagonistas de FcγRIIB son humanos o humanizados.

40 Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos que funcionan como antagonistas de FcγRIIB pueden administrarse a un sujeto con una malignidad de células B, según los métodos de la especificación. Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican derivados, análogos, fragmentos o variantes de las proteínas, polipéptidos o péptidos que funcionan como antagonistas de FcγRIIB pueden administrarse a un  
45 sujeto con una malignidad de células B según los métodos de la especificación. Preferiblemente, dichos derivados, análogos, variantes y fragmentos retienen la actividad antagonista de FcγRIIB de la proteína, polipéptido o péptido de longitud completa de tipo salvaje.

### 5.2 Conjugados de anticuerpo

La presente invención engloba anticuerpos fusionados recombinantemente o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentemente como no covalentemente) con polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido  
50 no relacionado; o parte de éste, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, sino que puede ocurrir a través de secuencias conectoras. Los anticuerpos pueden usarse por ejemplo para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos celulares particulares, bien *in vitro* o *in vivo*, mediante la fusión o conjugación de los anticuerpos a anticuerpos específicos para receptores particulares de la superficie celular. Los anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos  
55 heterólogos también pueden usarse en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando los métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett., 39:91-99; Patente U.S. No. 5.474.981; Gillies et al., 1992, Proc Natl Acad Sci, 89:1428-1432; y Fell et al., 1991, J. Immunol., 146:2446-2452.

Además, un anticuerpo puede conjugarse a un agente terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Los agentes terapéuticos o restos de fármaco no deben considerarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40), o toxina de la difteria, ricina, gelonina, y proteína antiviral de fitolaca, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo, pero no limitado a,  $\alpha$ -interferón (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -interferón (IFN- $\beta$ ), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador de plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I como se describe en la Publicación PCT No. WO 97/33899), AIM II (véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., 1994 *J. Immunol.*, 6:1567-1574), y VEGI (Publicación PCT No. WO 99/23105), un agente trombotico o un agente anti-angiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina (por ejemplo, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), y factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF")), factor estimulante de las colonias de macrófagos ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento ("GH")); una proteasa, o una ribonucleasa).

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

También se discute el uso de composiciones que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)<sub>2</sub>, o parte de éstos. Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos a partes de anticuerpo se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; Publicaciones Internacionales Nos. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-11341.

**00181** Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante técnicas de intercambio génico, intercambio de restos, intercambio de exones, y/o intercambio de codones (referidas colectivamente como "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades de anticuerpos de la invención o fragmentos de éstos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de éstos con mayores afinidades o menores velocidades de disociación). Véanse, generalmente las Patentes U.S. Nos. 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hansson, et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24:308. Los anticuerpos o fragmentos de éstos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de éstos, pueden alterarse sometiéndolos a mutagénesis aleatoria por PCR tendente a error, inserción de nucleótidos aleatoria u otros métodos antes de la recombinación. Una o más partes de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, cuyas partes se unen específicamente a Fc $\gamma$ R1IB, pueden recombinarse con uno o más componentes, restos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente invención también engloba anticuerpos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea incrementar la vida media en suero. Los anticuerpos pueden usarse en diagnóstico, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, materiales emisores de positrones, y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse bien directamente al anticuerpo o indirectamente, mediante un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico según la presente especificación. Dicho diagnóstico o detección puede conseguirse mediante el acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables incluyendo, pero no limitado a, varias enzimas, enzimas incluyendo, pero no limitado a, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero no limitado a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero no limitado a, umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero no limitado a, luciferasa, luciferina, y aequorina; material radioactivo al como, pero no limitado a, bismuto (<sup>213</sup>Bi), carbono (<sup>14</sup>C), cromo (<sup>51</sup>Cr), cobalto (<sup>57</sup>Co), flúor (<sup>18</sup>F), gadolinio (<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), germanio (<sup>68</sup>Ge), holmio (<sup>166</sup>Ho), indio (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), yodo (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), lantano (<sup>140</sup>La),

lutecio (<sup>177</sup>Lu), manganeso (<sup>54</sup>Mn), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), paladio (<sup>103</sup>Pd), fósforo (<sup>32</sup>P), praseodimio (<sup>142</sup>Pr), prometio (<sup>149</sup>Pm), renio (<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re), rodio (<sup>105</sup>Rh), rutenio (<sup>97</sup>Ru), samario (<sup>153</sup>Sm), escandio (<sup>47</sup>Sc), selenio (<sup>75</sup>Se), estroncio (<sup>85</sup>Sr), azufre (<sup>35</sup>S), tecnecio (<sup>99</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), estaño (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), tritio (<sup>3</sup>H), xenón (<sup>133</sup>Xe), iterbio (<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb), itrio (<sup>90</sup>Y), cinc (<sup>65</sup>Zn); metales que emiten positrones usando varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Un anticuerpo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de éstos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, un anticuerpo puede conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase anteriormente para ejemplos de materiales radiactivos). En determinadas realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son conocidas comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos son muy conocidas; véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, p. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, p. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, p. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, p. 303-16, Academic Press; y Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58, 1982.

Un anticuerpo o fragmento de éste, con o sin un resto terapéutico conjugado a él, administrado solo o en combinación con factor o factores citotóxicos y/o citoquina o citoquinas puede usarse como un terapéutico.

Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la Patente U.S. No. 4.676.980.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero no están limitados a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nilón, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

### 5.3 Preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales de la invención

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de exposición en fago, o una combinación de éstas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. 1988); Hammerling, et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, p. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procarota, o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y cribar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son rutinarios y muy conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, pueden inmunizarse ratones con un antígeno de interés o una célula que exprese dicho antígeno. Una vez se detecta la respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan por técnicas muy conocidas con cualesquiera células de mieloma adecuadas. Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitante. Los clones de hibridoma se ensayan entonces mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno.



Puede generarse fluido de ascitis, que en general contiene niveles altos de anticuerpos, inoculando ratones intraperitonealmente con clones de hibridoma positivos.

Se describe un método para producir anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos monoclonales se unen a FcγRIIA que comprende: inmunizar uno o más ratones transgénicos para FcγRIIA (Véanse U.S. 5.877.396 y U.S. 5.824.487) con el dominio extracelular purificado de FcγRIIB humano, aminoácidos 1-180; producir líneas celulares de hibridoma a partir de células del bazo de dichos ratones, cribar dichas líneas celulares de hibridoma para una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos se unen a FcγRIIA. También se proporciona un método para producir anticuerpos monoclonales frente a FcγRIIB que se unen específicamente a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, con una mayor afinidad de la que dichos anticuerpos monoclonales se unen a FcγRIIA, comprendiendo dicho método además: inmunizar uno o más ratones transgénicos para FcγRIIA con FcγRIIB purificado o un fragmento inmunogénico de éste, inmunizar con refuerzo dichos ratones un número suficiente de veces como para incitar una respuesta inmune, producir líneas celulares de hibridoma a partir de las células del bazo de dichos uno o más ratones, cribar dichas líneas celulares de hibridoma para una o más líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dichos anticuerpos se unen a FcγRIIA. Los dichos ratones pueden inmunizarse con FcγRIIB purificado, que se ha mezclado con cualquier adyuvante que se sabe en la técnica que aumenta la respuesta inmune. Los adyuvantes que pueden usarse en los métodos descritos incluyen, pero no están limitados a, adyuvantes proteicos; adyuvantes bacterianos, por ejemplo, bacterias completas (BCG, *Corynebacterium parvum*, *Salmonella minnesota*) y componentes bacterianos incluyendo esqueleto de la pared celular, dimicolato de trehalosa, monofosforil lípido A, residuo extraíble con metanol (MER) de *Bacillus tuberculoso*, adyuvante completo o incompleto de Freund; adyuvantes virales; adyuvantes químicos, por ejemplo, hidróxido de aluminio, yodoacetato y colestiril hemisuccinato o; adyuvantes de ADN desnudo. Otros adyuvantes que pueden usarse en los métodos descritos incluyen, toxina del cólera, proteínas de parpox, MF-59 (Chiron Corporation; Véase también Bieg et al., 1999, *Autoimmunity*, 31(1):15-24), MPL® (Corixa Corporation; Véase también Lodmell D.I. et al., 2000 *Vaccine*, 18: 1059-1066; Ulrich et al., 2000, *Methods in Molecular Medicine*, 273-282; Johnson et al., 1999, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 4640-4649; Baldrige et al., 1999 *Methods*, 19: 103-107), adyuvante RC-529 (Corixa Corporation; el compuesto líder de la biblioteca química de Corixa de aminoalquil glucosaminida 4-fosfato (AGP), véase también [www.corixa.com](http://www.corixa.com)), y adyuvante DETOX™ (Corixa Corporation; el adyuvante DETOX™ incluye el adyuvante MPL® (monofosforil lípido A) y esqueleto de pared celular micobacteriana; Véase también Eton et al., 1998, *Clin. Cancer Res*, 4(3):619-27; y Gubta R. et al., 1995, *Vaccine*, 13(14): 1263-76).

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

Por ejemplo, los anticuerpos también pueden generarse usando varios métodos de exposición en fago conocidos en la técnica. En los métodos de exposición en fago, se exponen dominios de anticuerpo funcionales en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótido que los codifican. Dicho fago puede utilizarse para exponer dominios de unión a antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado por enlace disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie o lecho sólido. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan como una proteína fusionada recombinantemente bien a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de exposición en fago que pueden usarse para preparar las inmunoglobulinas, o fragmentos de éstas, de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods*, 182:41-50, 1995; Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958, 1994; Persic et al., *Gene*, 187:9-18, 1997; Burton et al., *Advances in Immunology*, 57:191-280, 1994; Publicación PCT WO9201047; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes U.S. Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fago, las regiones que codifican el anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualesquiera otros fragmentos deseados, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de planta, levaduras, y bacterias, por ejemplo, como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> también pueden emplearse usando los métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la Publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6):864-869, 1992; y Sawai et al., *AJRI*, 34:26-34, 1995; y Better et al., *Science*, 240:1041-1043, 1988. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv y anticuerpos de cadena única incluyen los descritos en las Patentes U.S. Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203:46-88, 1991; Shu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7995-7999, 1993; y Skerra et al., *Science*, 240:1038-1040, 1988.

La tecnología de exposición en fago puede usarse para incrementar la afinidad de un anticuerpo de la invención para FcγRIIB. Esta técnica sería útil para la obtención de anticuerpos de alta afinidad que podrían usarse en los métodos combinatorios de la invención. La tecnología, referida como maduración por afinidad, emplea mutagénesis o paseo de CDR y re-selección usando FcγRIIB o un fragmento antigénico de éste para identificar anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno cuando se comparan con el anticuerpo inicial o parental (Véase, por ejemplo, Glaser et al., 1992, J. Immunology 149:3903). La mutagénesis de codones enteros en lugar de nucleótidos únicos resulta en un repertorio semi-aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un conjunto de clones variantes cada uno de los cuales se diferencia por una única alteración de aminoácidos en una única CDR y que contienen variantes que representan cada sustitución posible de aminoácidos para cada residuo de CDR. Los mutantes con afinidad de unión incrementada para el antígeno pueden cribarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con avidez incrementada para el antígeno (por ejemplo, ELISA) (Véase, Wu et al., 1998, Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037; Yelton et al., 1995, J. Immunology 155:1994). También es posible el paseo de CDR que aleatoriza la cadena ligera (Véase, Schier et al., 1996, J. Mol. Bio. 263:551).

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse adicionalmente por mapeo de epítomos, de manera que pueden seleccionarse los anticuerpos que tienen la mayor especificidad para FcγRIIB comparada con FcγRIIA. Los métodos de mapeo de epítomos de anticuerpos son muy conocidos en la técnica y están englobados en los métodos de la invención. En determinados casos, pueden usarse proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB en el mapeo del epítomo de un anticuerpo de la invención. En un caso específico, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada con la parte Fc de IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender además sustituciones de aminoácidos y/o reemplazos de determinadas regiones del receptor con la región correspondiente de un receptor homólogo, por ejemplo, FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 4 siguiente. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión de IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo C de FcγRIIB y el último con el extremo C de FcγRIIA y pueden usarse para diferenciar la unión del extremo C. Los otros tienen sustituciones de FcγRIIA en el sitio de unión de IgG y bien el extremo N de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula de receptor a la que se unen los anticuerpos.

Tabla 4. Lista de las proteínas de fusión que pueden usarse para investigar el epítomo de los anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB. Los residuos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión de IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negrita. La secuencia del extremo C APSSS es SEQ ID NO: 11 y la secuencia del extremo C VPSMGSSS es SEQ ID NO: 12.

Plásmido	Receptor	Extremo N	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C
pMGX125	RIIb	I <b>l</b> b	KKFSRSDPN	51	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX126	RIIa/b	I <b>l</b> a	<b>Q</b> KFSRLDPN	52	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX127		I <b>l</b> a	<b>Q</b> KFSRLDPT	53	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX128		I <b>l</b> b	<b>K</b> KFSRLDPT	54	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX129		na	<b>Q</b> KFSHLDPT	55	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX130		I <b>l</b> b	<b>K</b> KFSHLDPT	56	APS-----SS (I <b>l</b> b)
pMGX131		I <b>l</b> a	<b>Q</b> KFSRLDPN	52	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)
pMGX132		I <b>l</b> b	<b>K</b> KFSRSDPN	51	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)
pMGX133	RIIa-131R	I <b>l</b> a	<b>Q</b> KFSRLDPT	53	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)
pMGX134	RIIa-131H	I <b>l</b> a	<b>Q</b> KFSHLDPT	55	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)
pMGX135		I <b>l</b> b	<b>K</b> KFSRLDPT	54	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)
pMGX136		I <b>l</b> b	<b>K</b> KFSHLDPT	56	VPSMGSSS(I <b>l</b> a)

Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de la unión de un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención, por ejemplo, un ELISA. En otros casos, puede hacerse una confirmación adicional de la especificidad del epítipo usando péptidos con residuos específicos reemplazados por los de la secuencia de FcγRIIA.

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse para unión específica a FcγRIIB usando cualquier método con base inmunológica o bioquímica conocido en la técnica para caracterizar incluyendo cuantificar, la interacción del anticuerpo con FcγRIIB. La unión específica de un anticuerpo de la invención a FcγRIIB puede determinarse por ejemplo usando métodos con base inmunológica o bioquímica incluyendo, pero no limitado a, un ensayo ELISA, ensayos de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y diálisis en equilibrio. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmuno-específica y reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos en "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar sólo algunos. Dichos ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos de la invención también pueden ensayarse usando cualesquiera ensayos basados en resonancia de plasmón superficial conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de la interacción del anticuerpo con FcγRIIB. Cualquier instrumento SPR disponible comercialmente incluyendo, pero no limitado a, Instrumentos BIAcore, disponibles en AB (Uppsala, Suecia); instrumentos IAsys disponibles en Affinity Sensors (Franklin, MA.); sistema IBIS disponible en Windsor Scientific Limited (Berks, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA disponibles en Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y SPR Detector Spreeta disponible en Texas Instruments (Dallas, TX) puede usarse en la presente invención. Para una revisión de la tecnología basada en SPR véase Mullet et al., 2000, Methods 22: 77-91; Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23; Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101; Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61. Adicionalmente, cualquiera de los instrumentos SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en Patentes U.S. Nos. 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125 se contemplan en los métodos de la invención.

Brevemente, los ensayos basados en SPR implicar inmovilizar un miembro de una pareja de unión en una superficie, y monitorizar su interacción con el otro miembro de la pareja de unión en disolución en tiempo real. SPR se basa en medir el cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que ocurre después de la formación o disociación de complejos. La superficie en la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es la parte central de la tecnología SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base de un rango de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Una variedad de chips sensores está disponible comercialmente especialmente de las empresas listadas supra, todos los cuales pueden usarse en los métodos de la especificación. Los ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles en BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Chip Sensor CM5, SA, NTA, y HPA. Una molécula de la invención puede inmovilizarse en la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos de inmovilización y químicas conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a, acoplamiento covalente directo a través de grupos amina, acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, acoplamiento de aldehído a grupos carbohidrato, y unión a través de la etiqueta de histidina con chips NTA.

La especificidad de unión de los anticuerpos de la invención puede evaluarse por cualquier método conocido en la técnica para determinar las interacciones de parejas de unión, incluyendo, pero no limitado a ELISA, transferencia western, resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIAcore) y radioinmunoensayo. Cualquier método conocido en la técnica para evaluar la especificidad de unión puede usarse para identificar los anticuerpos de la especificación que presentan una  $K_d$  mayor de 0,001 nM pero no mayor de 5 nM, no mayor de 10 nM, no mayor de 15 nM, no mayor de 20 nM, no mayor de 25 nM, no mayor de 30 nM, no mayor de 35 nM, no mayor de 40 nM, no mayor de 45 nM, o no mayor de 50 nM según se determina por un ensayo BIAcore.

La presente especificación también proporciona anticuerpos de la invención, o fragmentos de éstos, que tienen una alta afinidad de unión para el antígeno de interés. En un caso específico, un polipéptido inmuno-específico de la presente especificación o fragmento de éste tiene una constante de velocidad de asociación o velocidad  $k_{asoc}$  (anticuerpo (Ab)+antígeno (Ag) Ab-Ag) de al menos  $10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ , o al menos  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ . En un caso preferido, un anticuerpo de la presente especificación o fragmento de éste tiene una  $k_{asoc}$  de al menos  $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ , o al menos  $10^8 M^{-1} s^{-1}$ .

En otro caso, un anticuerpo de la presente especificación o fragmento de éste tiene una velocidad  $k_{disoc}$  (anticuerpo

(Ab)+antígeno (Ag) Ab-Ag) menor de  $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ , o menor de  $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ . En un caso preferido, un anticuerpo de la presente especificación o fragmento de éste tiene una  $k_{\text{disoc}}$  menor de  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ , menor de  $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ , o menor de  $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ .

En otros casos más, un anticuerpo de la presente especificación o fragmento de éste tiene una constante de afinidad o  $K_a$  ( $k_{\text{asoc}}/k_{\text{disoc}}$ ) de al menos  $10^2 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , al menos  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , o al menos  $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ . En otro caso más, un anticuerpo de la presente especificación o fragmento de éste tiene una constante de disociación o  $K_d$  ( $k_{\text{disoc}}/k_{\text{asoc}}$ ) menor de  $10^{-2} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ , menor de  $10^{-3} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , menor de  $10^{-4} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ , menor de  $10^{-5} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , menor de  $10^{-6} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , menor de  $10^{-7} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ , menor de  $10^{-8} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ , menor de  $10^{-9} \text{ M}$ . En realizaciones que se encuentran en el alcance de las reivindicaciones especificadas, un anticuerpo de la presente invención o fragmento de éste tiene una constante de disociación o  $K_d$  ( $k_{\text{disoc}}/k_{\text{asoc}}$ ) menor de  $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ , menor de  $10^{-10} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ , menor de  $10^{-11} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ , menor de  $10^{-12} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ , menor de  $10^{-13} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ , menor de  $10^{-14} \text{ M}$ , menor de  $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ , menor de  $10^{-15} \text{ M}$ , o menor de  $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ .

También se describe la caracterización de los anticuerpos producidos por los métodos descritos en la presente memoria usando determinados ensayos de caracterización para identificar la función de los anticuerpos de la invención, particularmente la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización de la especificación pueden medir la fosforilación de residuos de tirosina en el resto ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de las células B. Los ensayos de caracterización pueden estar basados en células o ser ensayos sin células.

Se ha establecido bien en la técnica que en los mastocitos la coagregación de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, da lugar a la inhibición de la desgranulación, movilización de calcio, y producción de citoquinas inducidas por antígeno (Metcalf D.D. et al. 1997, *Physiol. Rev.* 77:1033; Long E.O. 1999 *Annu Rev. Immunol.* 17: 875). Los detalles moleculares de esta ruta de señalización se han elucidado recientemente (Ott V. L., 2002, *J. Immunol.* 162(9):4430-9). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en tirosina en su resto ITIM, y entonces recluta la inositol-5-fosfatasa que contiene homología con Src-2 (SHIP); una inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene un dominio SH2, que a su vez se fosforila y se asocia con Shc y p62<sup>dok</sup> (p62<sup>dok</sup> es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras, que incluye dominios de señalización tales como un dominio de homología de pleckstrina amino terminal (dominio PH), un dominio PTB, y una región carboxi terminal que contiene restos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino et al., 1997 *Cell*, 88: 197; Yamashi et al., 1997, *Cell*, 88:205)).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención pueden caracterizarse en la modulación de una o más respuestas mediadas por IgE. Preferiblemente, se usarán líneas celulares que co-expresan el receptor de alta afinidad para IgE y el receptor de baja afinidad para FcγRIIB en la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención en la modulación de respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, las células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. et al. 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317) transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa se usarán en los métodos de la especificación. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que se ha usado extensamente para estudiar los mecanismos de señalización posteriores a la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio, desgranulación, y producción de citoquinas inducidas por FcεRI (Malbec et al., 1998, *J. Immunol.* 160:1647; Daron et al., 1995 *J. Clin. Invest.* 95:577; Ott et al., 2002 *J. of Immunol.* 168:4430-4439).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención pueden caracterizarse por la inhibición de activación de mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, las células de una línea celular de leucemia basofílica de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. et al. 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317) que se han transfectado con FcγRIIB se sensibilizan con IgE y se estimulan bien con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anti-IgG de ratón de conejo, para agregar FcεRI solo, o con anti-IgG de ratón de conejo completa para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de moléculas de señalización aguas abajo puede ensayarse después de la adición de los anticuerpos de la invención a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, puede ensayarse la fosforilación de tirosina de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, activación de miembros de la familia MAP quinasa, incluyendo pero no limitado a Erk1, Erk2, JNK, o p38; y fosforilación de tirosina de p62<sup>dok</sup> y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular las células RBL-H23 bien con F(ab')<sub>2</sub> de anti-IgG de ratón de conejo (para agregar FcεRI solo e incitar la señalización mediada por FcεRI, como un control), o estimular células RBL-H23 con anti-IgG de ratón de conejo completa (para coagregar FcγRIIB y FcεRI, resultando en la inhibición de

la señalización mediada por FcεRI). Las células que se han estimulado con anticuerpos anti-IgG de ratón de conejo completos pueden pre-incubarse además con los anticuerpos de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcεRI de células que se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención y células que no se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células, indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la invención.

El ensayo ejemplar descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI evitando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Este ensayo identifica asimismo anticuerpos que aumentan la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI estimulando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

Preferiblemente, la actividad dependiente de FcεRI es al menos una o más de las siguientes: modulación de las moléculas de señalización aguas abajo (por ejemplo, modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación del reclutamiento de SHIP, modulación de la actividad MAP quinasa, modulación del estado de fosforilación de SHIP, modulación de la asociación SHIP y Shc SHIP y Shc, modulación del estado de fosforilación de p62<sup>dok</sup>, modulación de la asociación de p62<sup>dok</sup> y SHIP, modulación de la asociación de p62<sup>dok</sup> y RasGAP, modulación de la movilización de calcio, modulación de la desgranulación, y modulación de la producción de citoquinas). En otro caso preferido más, la actividad dependiente de FcεRI es la liberación de serotonina y/o el flujo de Ca<sup>++</sup> extracelular y/o activación de mastocitos dependiente de IgE. Un experto en la técnica sabe que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación de tirosina de FcγRIIB, estimula el reclutamiento de SHIP, estimula la fosforilación de tirosina de SHIP y la asociación con Shc, e inhibe la activación de miembros de la familia MAP quinasa incluyendo, pero no limitado a, Erk1, Erk2, JNK, p38. Los expertos en la técnica también saben que la coagregación de FcγRIIB y FcεRI estimula la fosforilación de tirosina aumentada de p62<sup>dok</sup> y su asociación con SHIP y RasGAP.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención pueden caracterizarse por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE mediante la monitorización y/o medición de la desgranulación de mastocitos o basófilos, preferiblemente en un ensayo basado en células. Preferiblemente, los mastocitos o basófilos para uso en dichos ensayos se han preparado por ingeniería para contener FcγRIIB humano usando métodos recombinantes estándar conocidos para un experto en la técnica. En un caso específico, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención se caracterizan por su capacidad de modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo basado en células de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos). La liberación de β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un evento primario en afección alérgica e inflamatoria aguda (Aketani et al., 2001 Immunol. Lett. 75: 185-9; Aketani et al., 2000 Anal. Chem. 72: 2653-8). La liberación de otros mediadores inflamatorios incluyendo pero no limitado a serotonina e histamina puede ensayarse para medir una respuesta mediada por IgE según los métodos de la invención. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, la liberación de los gránulos tales como los que contienen β-hexosaminidasa de mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia por el entrecruzamiento de los FcγRI con antígeno multivalente.

Un ensayo ejemplar para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención en la mediación de una respuesta mediada por IgE es un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa que comprende lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células con IgE de ratón sola o con IgE de ratón y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención; estimular las células con varias concentraciones de anti-F(ab)<sub>2</sub> de ratón de cabra, preferiblemente en un intervalo de 0,03 μg/mL a 30 μg/mL durante aproximadamente 1 hora; recoger el sobrenadante; lisar las células; y medir la actividad β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante por un ensayo colorimétrico, por ejemplo, usando p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida. La actividad β-hexosaminidasa liberada se expresa como un porcentaje de la actividad liberada respecto a la actividad total. La actividad β-hexosaminidasa liberada se medirá y comparará en células tratadas con antígeno solo; IgE sola; IgE y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, una vez las células se sensibilizan con IgE de ratón sola y se pulsan con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de un anti-IgG de ratón policlonal de cabra, la agregación y entrecruzamiento de FcγRI se produce ya que el anticuerpo policlonal reconoce la cadena ligera de la IgE murina unida al FcεRI; que a su vez da lugar a la activación y desgranulación del mastocito. Por otra parte, cuando las células se sensibilizan con IgE de ratón y un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención y se pulsan con fragmentos F(ab)<sub>2</sub> de un anti-IgG de ratón policlonal de cabra; el entrecruzamiento de FcγRI y FcγRIIB se produce, resultando en la inhibición de la desgranulación inducida por FcγRI. En cualquier caso, el anti-F(ab)<sub>2</sub> de ratón de cabra induce una liberación de β-hexosaminidasa dependiente de la dosis. En algunos casos, los anticuerpos anti-FcγRIIB unidos al receptor de FcγRIIB y entrecruzados con FcγRI no afectan la activación de la ruta inhibitoria, es decir, no hay alteración en el nivel de desgranulación en presencia de un anticuerpo anti-FcγRIIB. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB median una activación más fuerte del receptor inhibitorio, FcγRIIB, cuando están unidos por el anticuerpo anti-FcγRIIB, permitiendo un entrecruzamiento efectivo a FcγRI y activación de la ruta inhibitoria de FcγRIIB homólogo.

También se describe la caracterización del efecto de los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención en la respuesta celular mediada por IgE usando ensayos de movilización de calcio usando metodologías conocidas para un experto en la técnica. Un ensayo ejemplar de movilización de calcio puede comprender lo siguiente: cebar basófilos o

mastocitos con IgE; incubar las células con un indicador de calcio, por ejemplo, Fura 2; estimular las células como se ha descrito supra; y monitorizar y/o cuantificar la concentración de calcio intracelular por ejemplo usando citometría de flujo. La monitorización y/o cuantificación de la concentración de calcio intracelular puede ser por cualquier método conocido para un experto en la técnica, véase, por ejemplo, *Immunology Letters*, 2001, 75:185-9; *British J. of Pharm.*, 2002, 136:837-45; *J. of Immunology*, 168:4430-9 y *J. of Cell Biol.*, 153(2):339-49.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención inhiben la activación celular mediada por IgE. En otros casos, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención bloquean las rutas inhibitoras reguladas por FcγRIIB o bloquean el sitio de unión de ligando en FcγRIIB y aumentan así la respuesta inmune.

La capacidad de estudiar los mastocitos humanos ha estado limitada por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos a largo plazo adecuados. Recientemente, se han establecido dos nuevas líneas celulares de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre, designadas LAD 1 y LAD2, a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos (Kirshenbaum et al., 2003, *Leukemia research*, 27:677-82). Se ha descrito que ambas líneas celulares expresan FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. La invención engloba el uso de células LAD 1 y 2 en los métodos de la invención para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención en respuestas mediadas por IgE. En un caso específico, pueden usarse ensayos basados en células de liberación de β-hexosaminidasa tales como los descritos supra en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. En un ensayo ejemplar, se ceban mastocitos humanos, por ejemplo, LAD 1, con IgE humana quimérica anti-nitrofenol (NP) y se pulsan con BSA-NP, el antígeno polivalente, y se monitoriza la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum et al., 2003, *Leukemia research*, 27:677-682).

Si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, según se determina usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, tinción por FACS, puede ser difícil monitorizar y/o detectar diferencias en la activación de la ruta inhibitora mediada por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. También hay métodos alternativos, mediante los cuales la expresión de FcγRIIB puede regularse al alza usando citoquinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que FcγRIIB está altamente regulado al alza en líneas celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937, (Tridandapani et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop et al., 2001, *J. of Immunol.*, 166: 531-537) por IL4. La diferenciación de células U937 con dibutiril AMP cíclico se ha descrito que incrementa la expresión de FcγRII (Cameron et al., 2002 *Immunology Letters* 83, 171-179). Así, la expresión de FcγRIIB endógeno en mastocitos humanos para uso en los métodos de la especificación puede regularse al alza usando citoquinas, por ejemplo, IL-4, IL-13, con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención pueden caracterizarse por la inhibición de la señalización mediada por el receptor de las células B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas aguas abajo, tales como activación y proliferación de células B, producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR da lugar a la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR da lugar a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

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

Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, recientemente se ha demostrado que las células B activadas por lipopolisacárido (LPS) de ratones deficientes para SHIP presentan inhibición significativa mediada por FcγRIIB de la movilización de calcio, producción de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler A. et al., 2001, *Journal of Immunology*, 167(1): 204-211). De acuerdo con esto, pueden usarse células B *ex vivo* de ratones deficientes en SHIP para caracterizar los anticuerpos de la invención. Un ensayo ejemplar para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: aislar células B esplénicas de ratones deficientes para SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido, y estimular dichas células bien con F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que se han estimulado con anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB pueden pre-incubarse además con los anticuerpos de la invención. La actividad dependiente de FcγRIIB de las células puede medirse por técnicas estándar conocidas en la técnica. Comparar el nivel de actividad dependiente de FcγRIIB en células que se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención y células que no se han pre-incubado, y comparar los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos de la invención.

La medición de la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, medir la movilización de calcio intracelular por citometría de flujo, medir la fosforilación de Akt y/o Erk, medir la acumulación mediada por BCR de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, o medir la proliferación de las células B mediada por FcγRIIB.

Los ensayos pueden usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que modulan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR mediante el bloqueo del sitio de unión del ligando (IgG) al receptor de FcγRIIB y

antagonizar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR evitando la coagregación de FcγRIIB y BCR. Los ensayos también pueden usarse para identificar anticuerpos que aumentan la coagregación de FcγRIIB y BCR y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR.

5 También se discute la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención para señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor que porta el resto de activación basado en tirosina del inmunoreceptor (ITAM) actúa para regular a la baja la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como su efector (Tridandapani et al. 2002, J. Biol. Chem. 277(7):5082-9). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB resulta en la fosforilación rápida del residuo de tirosina en el resto ITIM de FcγRIIB, dando lugar a un aumento de la fosforilación de SHIP, asociación de SHIP con Shc, y fosforilación de proteínas que tienen el peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB resulta en la regulación a la baja de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina quinasa que está implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

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

25 Otro ensayo ejemplar para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: estimular células THP-1 bien con Fab de anticuerpo IV.3 de ratón anti-FcγRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcγRIIA solo e incitar la señalización mediada por FcγRIIA); o con anticuerpo anti-FcγRII de ratón y anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por FcγRIIA). Las células que se han estimulado con anticuerpo anti-FcγRII de ratón y anticuerpo anti-ratón de cabra pueden pre-incubarse además con los anticuerpos de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcγRIIA de células estimuladas que se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención y células que no se han pre-incubado con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcγRIIA en estas células, indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención.

35 El ensayo ejemplar descrito puede usarse, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión del ligando al receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA evitando la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Este ensayo identifica asimismo anticuerpos que aumentan la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

40 La caracterización de la función de los anticuerpos de la invención midiendo la capacidad de las células THP-1 de fagocitar células sanguíneas rojas de oveja (SRBC) opsonizadas con IgG fluoresceinada también se describe por métodos descritos previamente (Tridandapani et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ejemplar para medir la fagocitosis comprende: tratar células THP-1 con los anticuerpos de la invención o con un anticuerpo control que no se une a FcγRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en el que una diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubiertas con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unidas a células THP-1), y tasa fagocítica) indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención. Este ensayo puede usarse para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloquean la unión de ligando al receptor de FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que aumentan la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

50 En un caso preferido, los anticuerpos de la invención modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en al menos una o más de las maneras siguientes: modulación de las moléculas de señalización aguas abajo (por ejemplo, modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales alrededor de 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

55 Se discute la caracterización de los anticuerpos de la invención usando ensayos conocidos para los expertos en la técnica para identificar el efecto de los anticuerpos en la función efectora celular de anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, su capacidad de aumentar la actividad ADCC específica de tumor de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos terapéuticos que pueden usarse según los métodos de la especificación incluyen pero no están limitados a anticuerpos anti-tumorales, anticuerpos anti-virales, anticuerpos anti-microbianos (por ejemplo, bacterianos y parásitos unicelulares), ejemplos de los cuales se describen en la presente memoria (Sección 5.4.6).  
60 En particular, la invención engloba la caracterización de los anticuerpos de la invención por su efecto en la función

- efectora celular mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de tumor. Los ejemplos de funciones efectoras celulares que pueden ensayarse según la invención, incluyen pero no están limitados a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión de C1q, y citotoxicidad mediada por células dependiente de complemento. Puede usarse cualquier ensayo basado en células o sin células conocido para los expertos en la técnica para la determinación de la función efectora celular (Para ensayos de células efectoras, véase Perussia et al., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini et al., 1998 *Experientia*, 44(10): 841-8; Lehmann et al., 2000 *J. Immunol. Methods*, 243(1-2): 229-42; Browns EJ. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-64; Munn et al., 1990 *J. Exp. Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid et al., 2002 *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding et al., 1998, *Immunity* 8:403-411).
- Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para su efecto en actividad ADCC mediada por FcγR de anticuerpos terapéuticos en células efectoras, por ejemplo, células asesinas naturales, usando cualquiera de los métodos estándar conocidos para los expertos en la técnica (Véase, por ejemplo, Perussia et al., 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92). "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" tal y como se usan en la presente memoria presentan su significado ordinario y habitual en la técnica y se refieren a una reacción mediada por células *in vitro* en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR (por ejemplo, células monocíticas tales como células asesinas naturales (NK) y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. En principio, cualquier célula efectora con un FcγR activador puede ser activada para mediar ADCC. Las células primarias para mediar ADCC son células NK que expresan sólo FcγRIII, mientras los monocitos, dependiendo de su estado de activación, localización, o diferenciación, pueden expresar FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. Para una revisión de la expresión de FcγR en células hematopoyéticas véase, por ejemplo, Ravetch et al., 1991, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92.
- Las células efectoras son leucocitos que expresan uno o más FcγR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora ADCC. Las células efectoras que pueden usarse en los métodos de la especificación incluyen pero no están limitadas a células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y células NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente nativa de éstas, por ejemplo, de la sangre o PBMC como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC de la especificación son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente de sangre humana normal, usando métodos estándar conocidos para un experto en la técnica, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque. Por ejemplo, las PBMC pueden aislarse poniendo en capas sangre en Ficoll-Hypaque y centrifugando las células a 500g, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La capa leucocitaria puede recogerse como células efectoras. Otras células efectoras que pueden usarse en los ensayos de ADCC de la invención incluyen pero no están limitadas a macrófagos derivados de monocitos (MDM). Los MDM que se usan como células efectoras en los métodos de la especificación, se obtienen preferiblemente como preparaciones madre congeladas o se usan frescas (por ejemplo, de Advanced Biotechnologies, MD). En los casos más preferidos, se usan monocitos humanos elutriados como células efectoras en los métodos de la especificación. Los monocitos humanos elutriados expresan receptores activadores, FcγRIIIA y FcγRIIA y el receptor inhibidor, FcγRIIB. Los monocitos humanos están disponibles comercialmente y pueden obtenerse como preparaciones madre congeladas, descongeladas en medio basal que contiene 10% suero AB humano o en medio basal con suero humano que contiene citoquinas. Los niveles de expresión de los FcγR en las células pueden determinarse directamente; por ejemplo, usando análisis FACS. Alternativamente, también se puede dejar que las células maduren hasta macrófagos en cultivo. El nivel de expresión de FcγRIIB puede incrementarse en los macrófagos. Los anticuerpos que pueden usarse para la determinación del nivel de expresión de los FcγR incluyen pero no están limitados a anticuerpos anti-FcγRIIA humano, por ejemplo, IV.3-FITC; anticuerpos anti-FcγRI, por ejemplo, 32.2 FITC; y anticuerpos anti-FcγRIIIA, por ejemplo, 3G8-PE.
- Las células diana usadas en los ensayos ADCC de la especificación incluyen, pero no están limitadas a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de acceso ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp 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 (véase, por ejemplo, Epstein et al., 1965, *J. Natl. Cancer Inst.* 34: 231-240), células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein et al., 1968, *Cancer Res.* 28: 1300-10); líneas celulares de carcinoma de ovario, por ejemplo, OVCAR-3 con número de acceso ATCC HTB-161 (véase, por ejemplo, Hamilton, Young *et al.*, 1983), SK-OV-3, PA-1, CAOv3, OV-90, e IGROV-1 (disponibles del repositorio NCI Benard et al., 1985, *Cancer Research*, 45:4970-9. Las células diana deben ser reconocidas por el sitio de unión a antígeno del anticuerpo que se va a ensayar. Las células diana para uso en los métodos de la especificación pueden tener un nivel de expresión bajo, medio, o alto de un antígeno de cáncer. Los niveles de expresión del antígeno de cáncer pueden determinarse usando métodos comunes conocidos para un experto en la técnica, por ejemplo, análisis FACS. Por ejemplo, la especificación engloba el uso de células de cáncer de ovario tales como IGROV-1, en las que Her2/neu se expresa a diferentes niveles, u OV-CAR-3 (número de acceso ATCC HTB-161; caracterizada por una expresión menor de Her2/neu que SK-BR-3, la línea celular de carcinoma de mama). Otras líneas celulares de carcinoma de ovario que pueden usarse como células diana en los métodos de la especificación incluyen OVCAR-8 (Hamilton et al., 1983, *Cancer Res.* 43:5379-89); SK-OV-3 (número de acceso ATCC HTB-77); Caov-3 (número de acceso ATCC HTB-75); PA-1 (número de acceso ATCC CRL-1572); OV-90 (número de acceso ATCC CRL-11732); y OVCAR-4. Otras líneas celulares de cáncer de mama que pueden usarse en los métodos de la



especificación incluyen BT-549 (número de acceso ATCC HTB-122), MCF7 (número de acceso ATCC HTB-22), y Hs578T (número de acceso ATCC HTB-126), todas las cuales están disponibles en el repositorio NCI y ATCC. Otras líneas celulares que pueden usarse en los métodos de la especificación incluyen pero no están limitadas a CCRF-CEM (leucemia); HL-60 (TB, leucemia); MOLT-4 (leucemia); RPMI-8226 (leucemia); SR (leucemia); A549 (pulmón de células no pequeñas); EKVX (pulmón de células no pequeñas); HOP-62 (pulmón de células no pequeñas); HOP-92 (pulmón de células no pequeñas); NC1-H226 (pulmón de células no pequeñas); NCI-H23 (pulmón de células no pequeñas); NCI-H322M (pulmón de células no pequeñas); NCI-H460 (pulmón de células no pequeñas); NCI-H522 (pulmón de células no pequeñas); COLO 205 (colon); HCC-2998 (colon); HCT-116 (colon); HCT-15 (colon); HT29 (colon); KM12 (colon); SW-620 (colon); SF-268 (SNC); SF-295 (SNC); SF-539 (SNC); SNB-19 (SNC); SNB-75 (SNC); U251 (SNC); LOX 1MV1 (melanoma); MALME-3M (melanoma); M14 (melanoma); SK-MEL-2 (melanoma); SK-MEL-28 (melanoma); SK-MEL-5 (melanoma); UACC-257 (melanoma); UACC-62 (melanoma); IGR-OV1 (ovario); OVCAR-3, 4, 5, 8 (ovario); SK-OV-3 (ovario); 786-0 (renal); A498 (renal); ACHN (renal); CAK1-1 (renal); SN12C(renal); TK-10 (renal); UO-31 (renal); PC-3C (próstata); DU-145 (próstata); NCI/ADR-RES (mama); MDA-MB-231/ATCC (mama); MDA-MB-435 (mama); DMS 114 (pulmón de células pequeñas); y SHP-77 (pulmón de células pequeñas); todas las cuales están disponibles en NCI.

Un ensayo ejemplar para determinar el efecto de los anticuerpos de la invención en la actividad ADCC de anticuerpos terapéuticos se basa en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  que comprende: marcar las células diana con  $^{51}\text{Cr}[\text{Na}_2\text{CrO}_4$  (esta molécula permeable a la membrana celular se usa comúnmente para el marcaje ya que se une a proteínas citoplásmicas y aunque se libera espontáneamente de las células con cinéticas lentas, se libera masivamente después de la lisis de la célula diana); preferiblemente, las células diana expresan uno o más antígenos tumorales, opsonizar las células diana con uno o más anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a los antígenos tumorales expresados en la superficie celular de las células diana, en presencia y ausencia de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, 8B5.3.4, combinar las células diana radiomarcadas opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación a una proporción apropiada de células diana a células efectoras; incubar la mezcla de células preferiblemente durante 16-18 horas, preferiblemente a  $37^\circ\text{C}$ ; recoger los sobrenadantes; y analizar la radiactividad en las muestras de sobrenadante. La citotoxicidad de los anticuerpos terapéuticos en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención puede determinarse, por ejemplo, usando la fórmula siguiente: Porcentaje de lisis específica =  $(\text{lisis experimental} - \text{lisis independiente de anticuerpo}) / (\text{lisis máxima} - \text{lisis independiente de anticuerpo}) \times 100\%$ . Puede generarse un gráfico variando bien la proporción célula diana:célula efectora o la concentración de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse para citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) según el método descrito antes, véase, por ejemplo, Ding et al., *Immunity*, 1998, 8:403-11.

Los anticuerpos de la invención también pueden caracterizarse para la función de aumento de la actividad ADCC de anticuerpos terapéuticos en un ensayo basado *in vitro* y/o en un modelo animal.

También se incluye la determinación de la función de los anticuerpos de la invención en el aumento de la actividad ADCC específica de tumor usando un modelo de cáncer de ovario y/o un modelo de cáncer de mama.

Preferiblemente, los ensayos de ADCC se hacen usando más de una línea celular de cáncer, caracterizada por la expresión de al menos un antígeno de cáncer, en la que el nivel de expresión del antígeno de cáncer varía entre las líneas celulares de cáncer usadas. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, la realización de ensayos de ADCC en más de una línea celular en las que varía el nivel de expresión del antígeno de cáncer, permitirá la determinación de astringencia del aclaramiento tumoral de los anticuerpos de la invención. En una realización, los ensayos de ADCC se hacen usando líneas celulares de cáncer con diferentes niveles de expresión de un antígeno de cáncer.

En un ensayo ejemplar, OVCAR3, una línea celular de carcinoma de ovario, puede servir como la diana tumoral que expresa los antígenos tumorales, Her2/neu y TAG-72; monocitos humanos, que expresan el FcγRIIIA y FcγRIIA activadores y FcγRIIB inhibidor, pueden usarse como efectores; y los anticuerpos murinos específicos de tumor, ch4D5 y chCC49, pueden usarse como los anticuerpos específicos de tumor. Las células OVCAR-3 están disponibles en ATCC (número de acceso HTB-161). Preferiblemente, las células OVCAR-3 se propagan en medio suplementado con 0,01 mg/ml de insulina bovina. Pueden inyectarse  $5 \times 10^6$  células OVCAR-3 viables subcutáneamente (s.c.) en ratones atímicos desnudos con edad y peso concordante con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede calcularse por la fórmula:  $\text{longitud} \cdot (\text{anchura})^2 / 2$ , y preferiblemente no supera los 3 gramos. El tumor dependiente de anclaje puede aislarse después de 6-8 semanas, y las células pueden disociarse añadiendo 1  $\mu\text{g}$  de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor y 5 mg/mL de ARNasa, pasando a través de un colador celular y malla de nilón para aislar las células. Las células pueden congelarse para almacenamiento a largo plazo para inyección s.c. para el establecimiento del modelo de xenoinjerto.

Los hibridomas que secretan anticuerpos CC49 y 4D5 están disponibles en ATCC con los números de acceso HB-9459 y CRL-3D463 y las secuencias de nucleótidos de cadena pesada y cadena ligera son de dominio público (Murray et al., 1994 *Cancer* 73 (35):1057-66, Yamamoto et al., 1986 *Nature*, 319:230-4). Preferiblemente, los anticuerpos 4D5 y CC49 se quimerizan usando métodos estándar conocidos para un experto en la técnica de manera que la secuencia Fc humana, por ejemplo, la región constante humana de IgG1, se injerta en la región

variable de los anticuerpos murinos con el fin de proporcionar la función efectora. Los anticuerpos 4D5 y CC49 quiméricos se unen mediante su región variable a las líneas celulares diana y mediante su región Fc a los FcγR expresados en las células efectoras humanas. CC49 está dirigido a TAG-72; una mucina de alto peso molecular que está altamente expresada en muchas células de adenocarcinoma y carcinoma de ovario (Lottich et al., 1985 Breast Cancer Res. Treat. 6(1):49-56; Mansi et al., 1989 Int. J. Rad. Appl. Instrum B. 16(2):127-35; Colcher et al., 1991 Int. J. Rad. Appl. Instrum B. 18:395-41). El anticuerpo 4D5 está dirigido al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285-9). Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse entonces para investigar el aumento de la actividad ADCC de los anticuerpos específicos de tumor, mediante el bloqueo del FcγRIIB inhibidor. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, después de la activación de las células efectoras que expresan al menos un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIIA, aumenta la expresión del receptor inhibidor (FcγRIIB) y esto limita el aclaramiento de tumores ya que se suprime la actividad ADCC de FcγRIIA. Sin embargo, los anticuerpos de la invención pueden servir como un anticuerpo de bloqueo, es decir, un anticuerpo que evitará que la señal inhibidora se active y así la señal de activación, por ejemplo, actividad ADCC, se mantendrá durante un periodo más largo y puede resultar en un aclaramiento tumoral potente.

Preferiblemente, los anticuerpos de la especificación para uso en el aumento de la actividad ADCC se han modificado para comprender al menos una modificación de aminoácido, de manera que su unión a FcγR se ha disminuido, lo más preferiblemente suprimido. En algunos casos, los anticuerpos de la especificación se han modificado para comprender al menos una modificación de aminoácido que reduce la unión del dominio constante a un FcγR activador, por ejemplo, FcγRIIA, FcγRIIA, comparado con un anticuerpo de tipo salvaje de la especificación mientras retiene una actividad de bloqueo de FcγRIIB máxima. Los anticuerpos de la especificación pueden modificarse según cualquier método conocido para un experto en la técnica o descrito en la presente memoria. Puede usarse cualquier modificación de aminoácido que se sabe que interrumpe la función efectora según los métodos de la especificación tales como los descritos en las Publicaciones U.S. Nos. US2005/0037000 (presentada el 9 de enero, 2004) y US2005/0064514 (presentada el 28 de julio, 2004). En algunos casos, los anticuerpos de la especificación se modifican de manera que la posición 265 se modifica, por ejemplo, la posición 265 se sustituye con alanina. En casos preferidos, la región constante murina de un anticuerpo de la especificación se intercambia con la región constante humana correspondiente que comprende una sustitución del aminoácido en la posición 265 con alanina, de manera que se suprime la función efectora mientras se mantiene la actividad de bloqueo de FcγRIIB. Se ha mostrado que un único cambio de aminoácido en la posición 265 de la cadena pesada de IgG1 reduce significativamente la unión a FcγR sobre la base de ensayos ELISA, Sheilds et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(9):6591-604 y resultó en reducción de la masa tumoral. En otros casos, los anticuerpos de la especificación se modifican de manera que la posición 297 se modifica, por ejemplo, la posición 297 se sustituye con glutamina, de manera que se elimina el sitio de glicosilación ligado a N (véase, por ejemplo, Jefferies et al., 1995, Immunol. lett 44:111-7; Lund et al., 1996, J. Immunol., 157:4963-69; Wright et al., 1994, J. Exp. Med. 180:1087-96; White et al., 1997, J. Immunol. 158:426-35. La modificación en este sitio se ha reportado que suprime toda la interacción con los FcγR. En casos preferidos, la región constante murina de un anticuerpo de la especificación se intercambia con la región constante humana correspondiente que comprende una sustitución del aminoácido en la posición 265 y/o 297, de manera que se suprime la función efectora mientras se mantiene la actividad de bloqueo de FcγRIIB.

Un ensayo ejemplar para determinar la actividad ADCC de los anticuerpos específicos de tumor en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención es un ensayo fluorescente basado en europio no radiactivo (BATDA, Perkin Elmer) y puede comprender lo siguiente: marcar las células diana con un éster de acetoximetilo o éster potenciador de la fluorescencia que forma un ligando hidrofílico (TDA) con la membrana de las células por hidrólisis de los ésteres; este complejo es incapaz de dejar la célula y sólo se libera después de la lisis de la célula por los efectores; añadir las dianas marcadas a las células efectoras en presencia de anticuerpos anti-tumorales y un anticuerpo de la invención; incubar la mezcla de las células diana y efectoras durante 6 a 16 horas, preferiblemente a 37°C. El grado de actividad ADCC puede ensayarse midiendo la cantidad de ligando que se libera e interacciona con europio (reactivo DELFIA; PerkinElmer). El ligando y el europio forman un quelato muy estable y altamente fluorescente (EuTDA) y la fluorescencia medida es directamente proporcional al número de células lisadas. El porcentaje de lisis específica puede calcularse usando la fórmula: (lisis experimental-lisis independiente de anticuerpo/lisis máxima lisis independiente de anticuerpo x 100%).

En algunas realizaciones, si la sensibilidad del ensayo ADCC basado en fluorescencia es demasiado baja como para detectar actividad ADCC de los anticuerpos terapéuticos, la invención engloba ensayos de ADCC basados en radiactividad, tales como ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr. Los ensayos basados en radiactividad pueden hacerse en lugar de o en combinación con los ensayos de ADCC basados en fluorescencia.

Un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr ejemplar para caracterizar los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: marcar 1-2 x 10<sup>6</sup> células diana tales como células OVCAR-3 con <sup>51</sup>Cr; opsonizar las células diana con los anticuerpos 4D5 y CC49 en presencia y ausencia de un anticuerpo de la invención y añadir 5 x 10<sup>3</sup> células a una placa de 96 pocillos. Preferiblemente, 4D5 y CC49 están a una concentración que varía de 1-15 µg/mL; añadir las células diana opsonizadas a macrófagos derivados de monocitos (MDM) (células efectoras); preferiblemente a una proporción que varía de 10:1 a 100:1; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37°C; recoger los sobrenadantes; y analizar la radiactividad en el sobrenadante. La citotoxicidad de 4D5 y CC49 en presencia y ausencia de un anticuerpo de la invención puede determinarse, por ejemplo, usando la fórmula siguiente porcentaje

de lisis específica = (lisis experimental - lisis independiente de anticuerpo/lisis máxima - lisis independiente de anticuerpo) x 100%.

La actividad *in vivo* de los anticuerpos frente a FcγRIIB puede determinarse en modelos de xenoinjerto de tumor humano. Los tumores pueden establecerse usando cualquiera de las líneas celulares de cáncer descritas supra. En algunos casos, los tumores se establecerán con dos líneas celulares de cáncer, en el que la primera línea celular de cáncer se caracteriza por una baja expresión de un antígeno de cáncer y una segunda línea celular de cáncer, en el que la segunda línea celular de cáncer se caracteriza por una alta expresión del mismo antígeno de cáncer. El aclaramiento del tumor puede determinarse usando métodos conocidos para un experto en la técnica, usando un anticuerpo anti-tumoral que se une inmunoespecíficamente al antígeno de cáncer en la primera y segunda línea celular de cáncer, y un modelo de ratón apropiado, por ejemplo, un modelo de ratón desnudo Balb/c (por ejemplo, Jackson Laboratories, Taconic), con monocitos humanos transferidos de forma adoptiva y MDM como células efectoras. Cualquiera de los anticuerpos descritos supra puede ensayarse entonces en este modelo animal para evaluar el papel del anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención en el aclaramiento del tumor. Los ratones que pueden usarse incluyen por ejemplo FcγRIII -/- (donde FcγRIIIA está inactivado); ratones desnudos Fcγ-/-□ (donde FcγRI y FcγRIIIA están inactivados); o ratones con inserción génica de FcγRIIB humano o un ratón transgénico con inserción génica, donde los loci *fcgr2* y *fcgr3* del ratón en el cromosoma 1 están inactivados y los ratones expresan FcγRIIA humano, FcγRIIA humano, FcγRIIB humano, FcγRIIC humano, FcγRIIIA humano, y FcγRIIIB humano.

Un método ejemplar para ensayar la actividad *in vivo* de un anticuerpo de la invención puede comprender lo siguiente: establecer un modelo de xenoinjerto murino usando una línea celular de cáncer caracterizada por la expresión de un antígeno de cáncer y determinar el efecto de un anticuerpo de la invención en un anticuerpo específico para el antígeno de cáncer expresado en la línea celular de cáncer en la mediación del aclaramiento del tumor. Preferiblemente, la actividad *in vivo* se ensaya en paralelo usando dos líneas celulares de cáncer, en el que la primera línea celular de cáncer se caracteriza por un primer antígeno de cáncer expresado a bajos niveles y una segunda línea celular de cáncer, caracterizada por el mismo antígeno de cáncer expresado a un nivel mayor respecto a la primera línea celular de cáncer. Estos experimentos incrementarán así la astringencia de la evaluación del papel de un anticuerpo de la invención en el aclaramiento tumoral. Por ejemplo, los tumores pueden establecerse con la línea celular IGROV-1 y puede evaluarse el efecto de un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención en el aclaramiento tumoral de un anticuerpo específico de Her2/neu. Con el fin de establecer los modelos de xenoinjerto de tumor, pueden inyectarse  $5 \times 10^6$  células viables, por ejemplo, IGROV-1, SKBR3, por ejemplo, s.c., en ratones, por ejemplo, 8 ratones atímicos desnudos hembra con edad y peso concordantes usando por ejemplo Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor puede determinarse por la fórmula: longitud x (anchura)<sup>2</sup>/2; y preferiblemente no supera los 3 gramos. La inyección de células IGROV-1 s.c. da lugar a tumores con crecimiento rápido mientras la ruta i.p. induce una carcinomatosis peritoneal que mata a los ratones en 2 meses (Benard et al., 1985, Cancer Res. 45:4970-9). Como las células IGROV-1 forman tumores en 5 semanas, en el día 1 después de la inyección de las células tumorales, se co-inyectan monocitos como efectores i.p. junto con un anticuerpo terapéutico específico para Her2/neu, por ejemplo, Ch4D5, y un anticuerpo de la invención; por ejemplo, anticuerpo 8B5.3.4 quimérico ("ch8B5.3.4") como se ha descrito supra. Preferiblemente, los anticuerpos se inyectan a 4 µg cada uno por gramo de peso corporal de ratón (mbw). La inyección inicial se seguirá de inyecciones semanales de anticuerpos durante 4-6 semanas posteriormente a 2µg/semana. Las células efectoras humanas se reponen una vez en 2 semanas. Un grupo de ratones no recibirá anticuerpo terapéutico sino que se les inyectará un 4D5 quimérico que comprende una mutación N297A e IgG1 humana como anticuerpos de isotipo control para los anticuerpos anti-tumorales y anti-FcγRIIB, respectivamente. Los ratones se ponen en grupos de 4 y se monitorizan tres veces a la semana.

La Tabla 5 siguiente es una puesta a punto ejemplar para los estudios de aclaramiento tumoral según la invención. Como se muestra en la Tabla 5, se necesitarán seis grupos de 8 ratones cada uno para ensayar el papel de un anticuerpo de la invención en el aclaramiento tumoral, en el que se usa una combinación de célula diana y efectora y en el que se usan dos combinaciones diferentes de la concentración de anticuerpo. En el grupo A, sólo se inyectan células tumorales; en el grupo B se inyectan células tumorales y monocitos; en el grupo C, se inyectan células tumorales, monocitos, un anticuerpo anti-tumoral (ch4D5); en el grupo D, se inyectan células tumorales, monocitos, anticuerpo anti-tumoral, y un anticuerpo anti-FcγRII; en el grupo E, se inyectan células tumorales, monocitos y un anticuerpo anti-FcγRIIB; en el grupo F, se inyectan células tumorales, monocitos, Ch4D5 (N297Q), e IgG1 humana. Un experto en la técnica apreciará que pueden ensayarse varias concentraciones de anticuerpo de varias combinaciones de anticuerpo en los modelos de tumor descritos. Preferiblemente, los estudios usando una línea celular de cáncer de mama, por ejemplo, SKBR3, se llevan a cabo en paralelo al experimento descrito anteriormente.

**Tabla 5 Puesta a punto experimental ejemplar en ratones**

8 ratones/grupo	Célula tumoral s.c día 0	Monocitos i.p en el día 1	ch4D5 a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch4D5 N297Q a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch8B5.3.4 N297Q a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	IgG1 humana 4 µg/gm de mbw día 1 i.p
A	+	-		-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

El punto final de los modelos de xenoinjerto de tumor se determina sobre la base del tamaño de los tumores, peso de los ratones, tiempo de supervivencia y examen histoquímico e histopatológico del cáncer, usando métodos conocidos para un experto en la técnica. Se evaluará cada uno de los grupos de ratones en la Tabla 5. Los ratones se monitorizan preferiblemente tres veces a la semana. Los criterios para el crecimiento tumoral pueden ser distensión abdominal, presencia de masa palpable en la cavidad peritoneal. Preferiblemente, se calcularán estimaciones del peso tumoral frente a los días después de la inoculación. Una comparación de los criterios mencionados anteriormente de los ratones en el Grupo D comparado con los de los otros grupos definirá el papel de un anticuerpo de la invención en el aumento del aclaramiento tumoral. Preferiblemente, los animales tratados con anticuerpo estarán bajo observación durante 2 meses adicionales después del grupo control.

En ejemplos alternativos, pueden usarse ratones "con inserción génica" de FcγRIIB humano que expresan FcβRIIB humano en células efectoras murinas en el establecimiento de la actividad *in vivo* de los anticuerpos de la invención, en lugar de transferir de forma adoptiva células efectoras. Pueden generarse ratones fundadores que expresan el FcγRIIB humano por "inserción génica" del FcγRIIB humano en el locus de FcγRIIB de ratón. Los fundadores pueden retrocruzarse en el contexto desnudo y expresarán el receptor FcγRIIB humano. Las células efectoras murinas resultantes expresarán FcγRI y FcγRIIIA activadores endógenos y receptores FcγRIIB inhibidores humanos.

La actividad *in vivo* de los anticuerpos de la invención puede ensayarse además en un modelo murino de xenoinjerto con células derivadas de tumor primario humano, tal como células derivadas de carcinoma primario de ovario y mama humano. Las muestras de ascitis y efusión pleural de pacientes con cáncer pueden ensayarse para la expresión de Her2/neu, usando métodos conocidos para un experto en la técnica. Las muestras de pacientes con carcinoma de ovario pueden procesarse sedimentando las ascitis a 6.370g durante 20 minutos a 4°C, lisando las células sanguíneas rojas, y lavando las células con PBS. Una vez se determina la expresión de Her2/neu en las células tumorales, pueden seleccionarse dos muestras, una con expresión media y otra con expresión alta para inoculación s.c. para establecer el modelo de xenoinjerto de tumor. Las células tumorales aisladas se inyectarán i.p. en ratones para expandirlas células. Se puede inyectar a aproximadamente 10 ratones i.p. y las ascitis de cada ratón pasarse además a dos ratones para obtener ascitis de un total de 20 ratones que pueden usarse para inyectar a un grupo de 80 ratones. Las muestras de efusión pleural pueden procesarse usando un método similar al de las ascitis. Las células tumorales Her2/neu+ de las muestras de efusión pleural pueden inyectarse en las almohadillas mamarias superiores derecha e izquierda de los ratones.

En algunos ejemplos, si el porcentaje de células neoplásicas en las muestras de ascitis o efusión pleural es baja comparada con otros subconjuntos de células, las células neoplásicas pueden expandirse *in vitro*. En otros ejemplos, las células tumorales pueden purificarse usando lechos magnéticos recubiertos con anticuerpo CC49 (anti-TAG-72) como se ha descrito previamente, véase, por ejemplo, Barker et al., 2001, Gynecol. Oncol. 82:57, 63. Brevemente, pueden usarse lechos magnéticos recubiertos con anticuerpo de CC49 para separar las células de tumor de ovario que se separarán de los lechos por una incubación toda la noche a 37°C. En algunas realizaciones, si las células tumorales carecen del antígeno TAG-72, puede usarse una depleción negativa usando una mezcla de anticuerpos, tal como las proporcionadas por Stem Cell Technologies, Inc., Canadá, para enriquecer las células tumorales.

Pueden usarse otros marcadores tumorales además de Her2/neu para separar células tumorales obtenidas de las muestras de ascitis y efusión pleural de células no tumorales. En el caso de efusión pleural o tejido de mama, se ha reportado recientemente que pueden usarse como marcadores CD44 (una molécula de adhesión), B38.1 (un

marcador específico de cáncer de mama/ovario), CD24 (una molécula de adhesión), véase, por ejemplo, Al Hajj, et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983, 8. Una vez se purifican las células tumorales pueden inyectarse s.c. en ratones para expansión.

- 5 Preferiblemente, se realiza inmunohistoquímica e histoquímica en ascitis y efusión pleural de pacientes para analizar las características estructurales de la neoplasia. Dichos métodos son conocidos para un experto en la técnica y están englobados en la invención. Los marcadores que pueden monitorizarse incluyen por ejemplo citoqueratina (para identificar células neoplásicas y mesoteliales de ovario de células inflamatorias y mesenquimales); calretinina (para separar células mesoteliales de neoplásicas positivas para Her2neu); y CD45 (para separar células inflamatorias del resto de la población celular en las muestras). Los marcadores adicionales que pueden seguirse  
10 incluyen CD3 (células T), CD20 (células B), CD56 (células NK), y CD14 (monocitos). Un experto en la técnica apreciará que los métodos de inmunohistoquímica e histoquímica descritos supra, se aplican de forma análoga a cualquier célula tumoral para uso en los métodos de la invención. Después de la inoculación s.c. de las células tumorales, los ratones se siguen para cambios clínicos y anatómicos. Según se necesite, los ratones pueden someterse a necropsia para correlacionar a carga tumoral total con localización de órgano específica.
- 15 En un ejemplo específico, los tumores se establecen usando líneas celulares de carcinoma tales como células IGROV-1, OVCAR-8, SK-B, y OVCAR-3 y ascitis de carcinoma de ovario humano y efusión pleural de pacientes con cáncer de mama. Las ascitis contienen preferiblemente tanto los efectores como las dianas tumorales para los anticuerpos que se están ensayando. Se transferirán monocitos humanos como efectores.

- 20 La actividad *in vivo* de los anticuerpos de la invención también puede ensayarse en un modelo animal, por ejemplo, ratones desnudos Balb/c, a los que se inyectan células que expresan FcγRIIB, incluyendo pero no limitado a SK-BR-3 con número de acceso ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp 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 (véase, por ejemplo, Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10); líneas celulares de carcinoma de ovario, por  
25 ejemplo, OVCAR-3 con número de acceso ATCC HTB-161 (véase, por ejemplo, Hamilton, Young *et al.*, 1983), SK-OV-3, PA-1, CAO3, OV-90, e IGROV-1 (disponibles del repositorio NCI Benard et al., 1985, Cancer Research, 45:4970-9).

- 30 Un ensayo ejemplar para medir la actividad *in vivo* de los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: se inyectan a ratones desnudos hembra Balb/c (Taconic, MD) en el día 0 células que expresan FcγRIIB tales como  $5 \times 10^6$  células Daudi por ejemplo por la ruta subcutánea. Los ratones (por ejemplo, 5 ratones por grupo) también reciben una inyección i.p. de PBS (control negativo), ch 4.4.20 (anticuerpo anti-FITC) como un control negativo, y como control positivo otro anticuerpo de cáncer terapéutico tal como los descritos en la presente memoria, por ejemplo, Rituxan, (por ejemplo, a 10 µg/g) ó 10 µg/g de ch8B5.3.4 una vez a la semana empezando el día 0. Los ratones se observan, por ejemplo, dos veces a la semana después de la inyección, y se determina el tamaño tumoral (longitud y anchura) usando por ejemplo un calibrador. El peso tumoral en mg se estima usando la fórmula:  $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ .  
35

- 40 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen una eficacia aumentada en la disminución del tumor respecto a un anticuerpo terapéutico del cáncer cuando se administran a la misma dosis, por ejemplo, 10 µg /g, durante un periodo de tiempo de al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, o al menos 35 días. En los casos más preferidos, los anticuerpos de la invención reducen el tamaño tumoral al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces respecto a la administración de un anticuerpo terapéutico de cáncer a la misma dosis. En otro caso preferido más, los anticuerpos de la invención suprimen completamente el tumor.

### 5.3.1 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

- 45 La presente especificación también incluye polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la especificación (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón producido del clon de hibridoma 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11, ó 1F2 que tienen los números de acceso ATCC PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960, y PTA-5959, respectivamente), u otros anticuerpos monoclonales producidos por métodos de inmunización de la especificación, y versiones humanizadas de éstos, y métodos para producir los mismos.

- 50 La presente especificación engloba el polinucleótido que codifica la cadena pesada variable del anticuerpo 8B5.3.4, con número de acceso ATCC PTA-7610, como se describen en SEQ ID NO: 2. La presente especificación también engloba el polinucleótido que codifica la cadena ligera variable del anticuerpo 8B5.3.4, con número de acceso ATCC PTA-7610, como se describen en SEQ ID NO: 1.

- 55 Los métodos de la especificación también engloban polinucleótidos que hibridan bajo varias astringencias, por ejemplo, condiciones de alta astringencia, astringencia intermedia o baja, con los polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención. La hibridación puede realizarse bajo varias condiciones de astringencia. Como ejemplo y no limitación, los procedimientos que usan condiciones de baja astringencia son como sigue (véase, también, Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792). Se pretratan filtros que contienen ADN durante 6 h a 40°C en una disolución que contiene 35% formamida, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1% PVP,

0,1% Ficoll, 1% BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma disolución con las modificaciones siguientes: 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,2% BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, 10% (p/vol) sulfato de dextrano, y se usan 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con <sup>32</sup>P. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y se lavan durante 1,5 h a 55°C en una disolución que contiene 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA, y 0,1% SDS. La disolución de lavado se reemplaza con disolución fresca y se incuba 1,5 h adicionales a 60°C. Los filtros se secan con papel de filtro y se expusieron para autorradiografía. Si es necesario, los filtros se lavan una tercera vez a 65-68°C y se re-exponen a la película. Otras condiciones de baja astringencia que pueden usarse son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, como se emplea para hibridaciones entre especies). Como ejemplo y no limitación, los procedimientos que usan condiciones de alta astringencia son como sigue. La prehibridación de los filtros que contienen ADN se lleva a cabo durante 8 h a toda la noche a 65°C en un tampón compuesto por 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridan durante 48 h a 65°C en una mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 5-20 X 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada con <sup>32</sup>P. El lavado de los filtros se hace a 37°C durante 1 h en una disolución que contiene 2X SSC, 0,01% PVP, 0,01% Ficoll, y 0,01% BSA. Esto se sigue de un lavado en 0,1X SSC a 50°C durante 45 min antes de la autorradiografía. Otras condiciones de alta astringencia que pueden usarse son muy conocidas en la técnica. La selección de las condiciones apropiadas para dichas astringencias es muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; véase también, Ausubel et al., eds., en la serie *Current Protocols in Molecular Biology* del manual de técnicas de laboratorio, © 1987-1997, *Current Protocols*, © 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.; véase especialmente, Dyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis," En: *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Vol. 2, T.A. Brown, ed., p. 111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, Reino Unido).

Pueden obtenerse polinucleótidos, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, por cualquier método conocido en la técnica.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención, por ejemplo, 8B5.3.4) por hibridación con sondas específicas de Ig y/o amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

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

En un caso específico, una o más de las CDR se insertan en regiones marco usando técnicas de ADN recombinante rutinarias. Las regiones marco pueden ser naturales o regiones marco consenso, y preferiblemente regiones marco humanas (véase, por ejemplo, Chothia et al., 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 para un listado de regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo se une a FcγRIIA. Preferiblemente, como se ha discutido supra, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión de los anticuerpos de la invención a FcγRIIB.

En otro caso, pueden cribarse bibliotecas humanas o cualesquiera otras bibliotecas disponibles en la técnica, por técnicas estándar conocidas en la técnica, para clonar los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención.

### 5.3.2 Expresión recombinante de anticuerpos

Una vez se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificadoras de los anticuerpos y señales apropiadas de control de la transcripción y traducción. Esto métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación génica *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al. eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo puede transferirse a una célula huésped por técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal, y precipitación con fosfato de calcio) y las células transfectadas se cultivan por técnicas convencionales para producir el anticuerpo de la invención. En casos específicos, la expresión del anticuerpo está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

Las células huésped usadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención pueden ser bien células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen intermedio temprano principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para inmunoglobulinas (Foecking et al., 1998, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2).

Puede utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar los anticuerpos de la invención. Dichos sistemas de expresión huésped-vector representan vehículos mediante los que las secuencias codificadoras de los anticuerpos pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificadoras de nucleótidos apropiadas, pueden expresar los anticuerpos de la invención *in situ*. Éstos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformadas con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras de inmunoglobulinas; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfáticas (véase, U.S. 5.807.715), células Per C.6 (células retinianas de rata desarrolladas por Crucell)) que portan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido del anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos proteicos de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2:1791), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificadora lac Z de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509). También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de lechos de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir trombina o sitios de escisión de la proteasa factor Xa de manera que el producto génico diana clonado puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificadora del anticuerpo de interés puede ligarse en un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en huéspedes infectados. (por ejemplo, véase, Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359). Las señales de inicio específicas también pueden requerirse para la traducción eficiente de las secuencias codificadoras de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificadora deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto natural como sintético. La eficiencia de la expresión puede aumentarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544).

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o

modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos puede ser importante para las funciones de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación posterior a la traducción de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas de huésped apropiados para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen pero no están limitadas a CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para una producción de alto rendimiento, a largo plazo, de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse por ingeniería líneas celulares que expresen de forma estable un anticuerpo de la invención. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo secuencias de promotor, potenciador, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, puede dejarse que las células preparadas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para preparar por ingeniería líneas celulares que expresan los anticuerpos de la invención. Dichas líneas celulares preparadas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interactúan directamente o indirectamente con los anticuerpos de la invención.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia a al aminoglicósido G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; mayo, 1993, TIB TECH 11(5):155-215). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1; e higr, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30:147).

Los niveles de expresión de un anticuerpo de la invención pueden incrementarse por amplificación del vector (para una revisión, véase, Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells en DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo se puede amplificar, el incremento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también se incrementará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificadoras para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez el anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de Proteína A, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

#### 5.4 Métodos profilácticos y terapéuticos

También se discuten terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de uno o más de los anticuerpos de la invención a un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano,



para prevenir, tratar, o mejorar síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección, asociada con niveles o actividad aberrante de FcγRIIB y/o que se pueden tratar mediante la alteración de la función inmune asociada con la actividad de FcγRIIB o mediante el aumento de la actividad citotóxica de un segundo anticuerpo terapéutico o mediante el aumento de la eficacia de una composición de vacuna. En algunos casos, la terapia por administración de uno o más anticuerpos de la invención se combina con la administración de una o más terapias tales como, pero no limitadas a, quimioterapias, terapias de radiación, terapias hormonales, y/o terapias biológicas/inmunoterapias.

Los anticuerpos pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe en la presente memoria. Como se detalla más adelante, los anticuerpos de la invención pueden usarse en métodos para tratar cáncer (particularmente para aumentar la inmunoterapia pasiva o eficacia de una vacuna de cáncer), enfermedad autoinmune, trastornos inflamatorios o alergias (por ejemplo, para aumentar la eficacia de una vacuna para el tratamiento de la alergia).

Se ha encontrado que FcγRIIB (CD32B) se expresa en los tipos tisulares siguientes: adiposo, células b, hueso, cerebro, cartílago, colon, endocrino, ojo, feto, tracto gastrointestinal, genitourinario, célula germinal, cabeza y cuello, riñón, pulmón, nódulo linfático, linforeticular, glándula mamaria, músculo, nervioso, ovario, páncreas, islote pancreático, glándula pituitaria, placenta, retina, piel, tejido blando, sinovio, y útero (datos recogidos del Cancer Genome Anatomy Project del National Cancer Institute). Así, los anticuerpos de la invención pueden usarse para agonizar o antagonizar la actividad de FcγRIIB en cualquiera de estos tejidos. Por ejemplo, FcγRIIB se expresa en la placenta y puede jugar un papel en el transporte de IgG al feto y también en el secuestro de complejos inmunes (Lyden et al., 2001, J. Immunol. 166:3882-3889). En determinados casos de la invención, un anticuerpo anti-FcγRIIB puede usarse como un abortivo.

Los presentes inventores han encontrado que los neutrófilos no expresan, sorprendentemente, niveles significativos de FcγRIIB. De acuerdo con esto, se proporcionan métodos y composiciones farmacéuticas para uso en estos métodos, que comprenden una cantidad de anticuerpo específico de CD32 que se une a y tiene actividad en células tumorales o tipos celulares distintos de neutrófilos, tal como macrófagos, pero no se une de forma detectable o tiene actividad detectable en neutrófilos. En determinados casos, los anticuerpos de la invención pueden usarse para deplecionar células CD32B<sup>+</sup>, tales como macrófagos o células tumorales que expresan CD32B.

Los anticuerpos de la presente invención que funcionan como un agente profiláctico y o terapéutico de una enfermedad, trastorno, o infección pueden administrarse a un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno, o infección. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento, prevención o gestión de una enfermedad, trastorno, o infección asociado con niveles o actividad aberrante de FcγRIIB y/o que se pueden tratar alterando la función inmune asociada con la actividad de FcγRIIB. Uno o más anticuerpos de la invención pueden administrarse a un mamífero, preferiblemente un ser humano, concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento del cáncer. El término "concurrentemente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos a exactamente el mismo tiempo, sino que quiere decir que los anticuerpos de la invención y el otro agente se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos de la invención pueden actuar conjuntamente con el otro agente para proporcionar un beneficio incrementado respecto al caso de que fueran administrados de otra manera. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos de tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse separadamente, en cualquier forma apropiada y por cualquier ruta adecuada.

En varios casos, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con una separación de menos de 1 hora, con una separación de aproximadamente 1 hora, con una separación de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, con una separación de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, con una separación de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, con una separación de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, con una separación de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, con una separación de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, con una separación de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, con una separación de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, con una separación de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, con una separación de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, con una separación de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, con una separación de no más de 24 horas o con una separación de no más de 48 horas. En casos preferidos, dos o más compuestos se administran en la misma visita del paciente.

Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en la presente memoria están englobadas por los términos terapéuticamente efectivo y profilácticamente efectivo. La dosificación y frecuencia típicamente variarán además según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y tipo de cáncer, la ruta de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta, y el historial médico pasado del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por un experto en la técnica considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones reportadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference (56a ed., 2002).

Los anticuerpos de esta invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, proteínas de fusión Fc, o con linfoquinas, citoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10 y TGF- $\beta$ ), que aumentan Fc $\gamma$ RIIB, por ejemplo, sirven para incrementar el número o actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos e incrementan la respuesta inmune. En determinadas realizaciones, una citoquina se conjuga con un anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RIIB.

Los anticuerpos de esta invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, trastorno, o infección, tales como, por ejemplo, agentes anticancerosos, agentes anti-inflamatorios o agentes anti-virales, por ejemplo, como se detalla en las secciones 5.4.6 y 5.4.5 siguientes.

#### 5.4.1 Cánceres

Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento de tumores primarios o metástasis de células cancerosas. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos usados en la inmunoterapia del cáncer y puede incluir el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con otro anticuerpo terapéutico para aumentar la eficacia de dicha inmunoterapia mediante el incremento de la potencia de la función efectora del anticuerpo terapéutico, por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, los anticuerpos de la invención bloquean Fc $\gamma$ RIIB, preferiblemente en monocitos y macrófagos y aumentan así los beneficios terapéuticos y eficacia clínica de los anticuerpos específicos de tumor, por ejemplo, aumentando el aclaramiento de los tumores mediado por Fc $\gamma$ R activadores. De acuerdo con esto, la especificación proporciona métodos para prevenir o tratar cáncer caracterizado por un antígeno de cáncer, cuando se administran en combinación con otro anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de cáncer y es citotóxico. Los anticuerpos de la invención son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, particularmente para potenciar la actividad citotóxica de anticuerpos terapéuticos específicos de antígenos del cáncer con actividad citotóxica para aumentar la muerte de las células tumorales por los anticuerpos de la invención y/o aumentar, por ejemplo, la actividad ADCC o actividad CDC de los anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse con proteínas de fusión Fc. Un anticuerpo de la invención, cuando se administra solo o en combinación con un anticuerpo terapéutico citotóxico, puede inhibir o reducir el crecimiento de tumor primario o metástasis de células cancerosas al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% respecto al crecimiento de tumor primario o metástasis en ausencia de dicho anticuerpo de la invención. En un caso preferido, los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo terapéutico citotóxico inhiben o reducen el crecimiento de tumor primario o metástasis de cáncer al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% respecto al crecimiento o metástasis en ausencia de dichos anticuerpos.

La transición de un estado normal a uno maligno es un proceso con múltiples etapas que implica cambios genéticos y epigenéticos. De hecho, ocurren numerosas alteraciones en los circuitos de regulación celular que facilitan esta progresión que permite que las células tumorales evadan el compromiso de diferenciación terminal y quiescencia que regulan normalmente la homeostasis tisular. Determinados genes se han implicado en la capacidad de invasión y potencial metastásico de las células cancerosas tales como CSF-1 (factor estimulante de colonias 1 o factor estimulante de colonias de macrófagos). Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, CSF-1 puede mediar la progresión y la metástasis tumoral mediante el reclutamiento de macrófagos en el sitio tumoral donde estimulan la progresión del tumor. Se cree que los macrófagos tienen un papel trófico en la mediación de la progresión y metástasis tumoral quizá por la secreción de factores angiogénicos, por ejemplo, timidina fosforilasa, factor de crecimiento derivado del endotelio vascular; secreción de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico que podrían actuar como un factor paracrino en las células tumorales, y estimular así la migración de las células tumorales e invasión en vasos sanguíneos. (Véase, por ejemplo, Lin et al., 2001, *J. Exp. Med.* 193(6): 727-739; Lin et al., 2002, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasms* 7(2): 147-162; Scholl et al., 1993, *Molecular Carcinogenesis*, 7: 207-11; Clynes et al., 2000, *Nature Medicine*, 6(4): 443-446; Fidler et al., 1985, *Cancer Research*, 45: 4714-26).

Los anticuerpos de la invención pueden bloquear la progresión y metástasis de células tumorales mediadas por macrófagos. Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de tumores sólidos, donde ocurre la infiltración de macrófagos. Los anticuerpos antagonistas de la invención son particularmente útiles para controlar, por ejemplo, reducir o eliminar, la metástasis de las células tumorales, reduciendo o eliminando la población de macrófagos que está localizada en el sitio tumoral. Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos para controlar la metástasis de las células tumorales. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, los anticuerpos antagonistas de la invención, cuando se administran solos se unen al Fc $\gamma$ RIIB inhibitor en macrófagos y reducen eficazmente la población de macrófagos y restringen así la progresión de las células tumorales. Los anticuerpos antagonistas de la invención reducen, o preferiblemente eliminan macrófagos que están localizados en el sitio del tumor, ya que Fc $\gamma$ RIIB se expresa preferentemente en monocitos y

macrófagos activados incluyendo macrófagos que se infiltran en el tumor. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en el tratamiento de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de CSF-1, incluyendo pero no limitado a cánceres de mama, uterino y de ovario.

5 También se describen anticuerpos que deplecionan o eliminan eficazmente células inmunes distintas de macrófagos que expresan FcγRIIB, por ejemplo, células dendríticas y células B. La depleción o eliminación efectiva de células inmunes usando los anticuerpos de la invención puede variar de una reducción en la población de las células inmunes un 50%, 60%, 70%, 80%, preferiblemente 90%, y lo más preferiblemente 99%. Así, los anticuerpos de la invención tienen una eficacia terapéutica aumentada bien solos o en combinación con un segundo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico tal como anticuerpos anti-tumorales, anticuerpos anti-virales, y anticuerpos anti-microbianos. Los anticuerpos terapéuticos pueden tener especificidad para una célula cancerosa o una célula inflamatoria. El segundo anticuerpo puede unirse a una célula normal. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, cuando los anticuerpos de la invención se usan solos para deplecionar células inmunes que expresan FcγRIIB, la población de células se redistribuye de manera que efectivamente las células que permanecen tienen los receptores Fc activadores y así se alivia la supresión por FcγRIIB. Cuando se usa en combinación con un segundo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, la eficacia del segundo anticuerpo se aumenta mediante el incremento de la función efectora mediada por Fc del anticuerpo.

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: leucemias incluyendo, pero no limitado a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como pero no limitado a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como pero no limitado a enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin; mielomas múltiples tales como pero no limitado a mieloma múltiple quiescente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammopatía monoclonal de significancia indeterminada; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas de hueso y de tejido conectivo tales como pero no limitado a sarcoma de huesos, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes maligno, fibrosarcoma del hueso, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomiomasarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo pero no limitado a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco cerebral, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (célula pequeña), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget, y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal incluyendo, pero no limitado a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como pero no limitado a cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, incluyendo pero no limitado a, insulinooma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios incluyendo pero no limitado a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia, y diabetes insipidus; cánceres oculares incluyendo, pero no limitado a, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroidal, y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales incluyendo, pero no limitado a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y melanoma; cáncer vulvar incluyendo, pero no limitado a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres del cuello uterino incluyendo, pero no limitado a, carcinoma de células escamosas, y adenocarcinoma; cánceres uterinos incluyendo, pero no limitado a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario incluyendo, pero no limitado a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limfótrofo, tumor de células germinales, y tumor estromal; cánceres esofágicos incluyendo pero no limitado a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso, y carcinoma microcelular (célula pequeña); cánceres de estómago incluyendo pero no limitado a, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulceroso, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma, y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado incluyendo pero no limitado a carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de la vesícula biliar incluyendo pero no limitado a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas incluyendo pero no limitado a, papilar, nodular, y difuso; cánceres de pulmón incluyendo pero no limitado a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares incluyendo pero no limitado a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo pero no limitado a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, y rhabdomiomasarcoma; cánceres del pene; cánceres orales incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de la glándula salivar incluyendo pero no limitado a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, y carcinoma adenoide; cánceres de faringe incluyendo pero no limitado a, cáncer de células escamosas, y verrugoso; cánceres de la piel incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, y melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón

- incluyendo pero no limitado a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uretra); tumor de Wilms; cánceres de la vejiga incluyendo pero no limitado a, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2a Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia y Murphy et al., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).
- De acuerdo con esto, los métodos descritos en la presente memoria y las composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento o prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades con proliferación anormal, incluyendo (pero no limitado a) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Berkett; tumores hematopoyéticos del linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer de tiroides folicular y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis también se tratarían por los métodos descritos y las composiciones de la invención. Dichos cánceres pueden incluir pero no están limitados a linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En algunos casos, la malignidad o cambios en la proliferación (tales como metástasis y displasias), o trastornos hiperproliferativos, se tratan o previenen por los métodos descritos en la presente memoria y composiciones de la invención en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, páncreas, o útero. En otros casos, se trata o previene sarcoma, melanoma, o leucemia por los métodos descritos en la presente memoria y composiciones de la invención.
- Los cánceres asociados con los antígenos de cáncer pueden tratarse o prevenirse por la administración de los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo que se une al antígeno de cáncer y es citotóxico. Los anticuerpos de la invención pueden aumentar el efecto citotóxico mediado por anticuerpo del anticuerpo dirigido al antígeno de cáncer particular. Por ejemplo, pero no como limitación, los cánceres asociados con el antígeno de cáncer siguiente pueden tratarse o prevenirse por los métodos y composiciones de la invención. Antígeno de carcinoma general KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142:32-37; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4):407-415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, *Cancer Res.* 51(2):48-475), fosfato ácido prostático (Tailor et al., 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(1):4928), antígeno específico de la próstata (Henttu y Viikho, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli et al., 1993, *Cancer Res.* 53:227-230), antígeno asociado a melanoma p97 (Estin et al., 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6):445-44), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali et al., 1987, *Cancer* 59:55-3; Mittelman et al., 1990, *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13:294), antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno de glóbulos de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, *Cancer Res.* 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, *Int. J. Cancer* 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, *J. Clin. Immunol.* 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie et al., 1994, *Blood* 83:1329-1336), antígeno de linfoma de células B humanas CD20 (Reff et al., 1994, *Blood* 83:435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, *J. Nucl. Med.* 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, *Cancer Res.* 53:5244-5250), antígeno de tipo trasplante específico de tumor de la superficie celular (TSTA) tales como antígenos tumorales inducidos viralmente incluyendo antígeno T de ADN virus de tumor y antígenos de cubierta de virus de tumor de ARN, antígeno oncofetal-alfafetoproteína tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom et al., 1985, *Cancer Res.* 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, *Cancer Res.* 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, *J. of Immun.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185<sup>HER2</sup>), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17:359), antígeno de linfocitos malignos humanos APO-1 (Bernhard et al., 1989, *Science* 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314:53-57) tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5,y D,56-22 encontrados en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le<sup>7</sup> encontrad en células de carcinoma embrionarias, TL5

(grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E<sub>1</sub> (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le<sup>a</sup>) encontrado en adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le<sup>b</sup>), G49, receptor de EGF, (grupo sanguíneo ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>) encontrado en adenocarcinoma colónico, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T<sub>5</sub>A<sub>7</sub> encontrado en células mieloides, R<sub>24</sub> encontrado en melanoma, 4.2, G<sub>D3</sub>, D1.1, OFA-1, G<sub>M2</sub>, OFA-2, G<sub>D2</sub>, M1:22:25:8 encontrados en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en el estadio de 4-8 células. El antígeno puede ser un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneo (véase Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualesquiera anticuerpos de cáncer terapéuticos conocidos en la técnica para aumentar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden usarse con cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 7, que tienen utilidad terapéutica demostrada en el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos de la invención aumentan la eficacia del tratamiento de los anticuerpos de cáncer terapéuticos mediante el aumento de al menos una función efectora mediada por el anticuerpo de dichos anticuerpos del cáncer terapéuticos. Los anticuerpos pueden utilizarse para aumentar la eficacia del tratamiento mediante el aumento de la cascada dependiente de complemento de dichos anticuerpos del cáncer terapéuticos. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para aumentar la eficacia del tratamiento mediante el aumento de la fagocitosis y opsonización de las células tumorales diana. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para aumentar la eficacia del tratamiento mediante el aumento de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo ("ADCC") en la destrucción de las células tumorales diana.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con productos basados en dinucleótidos citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o están siendo desarrollados actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, la invención engloba el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en los métodos y composiciones de la invención para el tratamiento y/o prevención del cáncer (Véase también Warren et al., 2002, *Semin Oncol.*, 29(1 supl 2):93-7; Warren et al., 2000, *Clin Lymphoma*, 1(1):57-61).

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con un anticuerpo terapéutico que no medie su efecto terapéutico a través de la muerte celular para potenciar la actividad terapéutica del anticuerpo. También se discute el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con un anticuerpo terapéutico que induce apoptosis con actividad agonista, por ejemplo, un anticuerpo anti-Fas. Los anticuerpos anti-Fas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, Jo2 (Ogasawara et al., 1993, *Nature* 364: 806) y HFE7 (Ichikawa et al., 2000, *Int. Immunol.* 12: 555). Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, FcγRIIB se ha implicado en la estimulación de apoptosis mediada por anti-Fas, véase, por ejemplo, Xu et al., 2003, *Journal of Immunology*, 171: 562-568. De hecho, el dominio extracelular de FcγRIIB puede servir como un agente de entrecruzamiento para los receptores Fas, dando lugar a un complejo funcional y estimulando la apoptosis dependiente de Fas. En algunos casos, los anticuerpos de la invención bloquean la interacción de los anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, dando lugar a una reducción de la actividad apoptótica mediada por Fas. Los anticuerpos de la invención que resultan en una reducción en la actividad apoptótica mediada por Fas son particularmente útiles en combinación con anticuerpos anti-Fas que tienen efectos secundarios indeseables, por ejemplo, hepatotoxicidad. En otros casos, los anticuerpos de la invención aumentan la interacción de los anticuerpos anti-Fas y FcγRIIB, dando lugar a un aumento de la actividad apoptótica mediada por Fas. La combinación de los anticuerpos de la invención con anticuerpos terapéuticos que inducen apoptosis con actividad agonista tiene una eficacia terapéutica aumentada.

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

Se discute un método para tratar enfermedades con señalización mediada por apoptosis alterada, por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmune, tal como un método para tratar una enfermedad con apoptosis mediada por Fas deficiente, comprendiendo dicho método administrar un anticuerpo de la invención en combinación con un anticuerpo anti-Fas.

Los anticuerpos agonistas de la invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de tumores de origen no hematopoyético, incluyendo tumores de células de melanoma. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, la eficacia de los anticuerpos agonistas de la invención se debe, en parte, a la activación de la ruta inhibidora de FcγRIIB, ya que los tumores de origen no hematopoyético, incluyendo los tumores de células de melanoma expresan FcγRIIB. Experimentos recientes han mostrado de hecho que la expresión de FcγRIIB en células de melanoma modula el crecimiento tumoral por la interacción directa con anticuerpos anti-tumorales (por ejemplo, por unión de la región Fc de los anticuerpos anti-tumorales) de una manera dependiente intracitoplásmica (Cassard et al., 2002, *Journal of Clinical Investigation*, 110(10): 1549-1557).

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos terapéuticos que se unen inmuno-específicamente a antígenos tumorales que no se expresan en las células tumorales en sí mismas, sino en las células no malignas, reactivas circundantes y que apoyan el tumor, que comprenden el estroma tumoral. El

estroma tumoral comprende células endoteliales que forman nuevos vasos sanguíneos y fibroblastos estromales que rodean a la vasculatura tumoral. Un anticuerpo de la invención puede usarse en combinación con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a antígeno tumoral en una célula endotelial. Un anticuerpo de la invención puede usarse en combinación con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno tumoral en una célula de fibroblasto, por ejemplo, la proteína de activación de fibroblastos (FAP). FAP es una glicoproteína de 95 KDa homodimérica de tipo II que se expresa altamente en los fibroblastos estromales de muchos tumores sólidos, incluyendo, pero no limitado a carcinomas de pulmón, mama, y colorrectal. (Véase, por ejemplo, Scanlan et al., 1994; Proc. Natl. Acad. USA, 91: 5657-61; Park et al., 1999, J. Biol. Chem., 274: 36505-12; Rettig et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3110-3114; Garin-Chesea et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7235-7239). Los anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a FAP se conocen en la técnica y están englobados en la invención, véase, por ejemplo, Wuest et al., 2001, Journal of Biotechnology, 159-168; Mersmann et al., 2001, Int. J. Cancer, 92: 240-248; Patente U.S. No. 6.455.677.

Recientemente, las IgE se han implicado como mediadores del crecimiento tumoral y de hecho las reacciones de hipersensibilidad e inflamación alérgica inmediatas a las que está dirigida la IgE se han propuesto como posibles mecanismos naturales implicados en las respuestas anti-tumorales (Para una revisión, véase, por ejemplo, Mills et al., 1992, Am. Journal of Epidemiol. 122: 66-74; Eriksson et al., 1995, Allergy 50: 718-722). De hecho, un estudio reciente ha mostrado que la carga de células tumorales con IgE reduce el crecimiento tumoral, dando lugar en algunos casos a rechazo tumoral. Según este estudio, las células tumorales cargadas con IgE no sólo poseen un potencial terapéutico sino que también confieren inmunidad antitumoral a largo plazo, incluyendo la activación de mecanismo efector de inmunidad innata y respuesta inmune adaptativa mediada por células T, véase, por ejemplo, Reali et al., 2001, Cancer Res. 61: 5516-22; que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Los anticuerpos antagonistas de la invención pueden usarse en el tratamiento y/o prevención de cáncer en combinación con la administración de IgE con el fin de aumentar la eficacia de la terapia de cáncer mediada por IgE. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, los anticuerpos de la invención aumentan la eficacia terapéutica del tratamiento de tumores con IgE, mediante el bloqueo de la ruta inhibidora. Los anticuerpos antagonistas de la invención pueden aumentar la eficacia terapéutica de la terapia de cáncer mediada por IgE (i) aumentando el retraso en el crecimiento tumoral; (ii) aumentando la disminución en la velocidad de progresión tumoral; (iii) aumentando el rechazo tumoral; o (iv) aumentando la inmunidad protectora respecto al tratamiento de cáncer con IgE sola.

Las terapias de cáncer y sus dosificaciones, rutas de administración y uso recomendado, se conocen en la técnica y se han descrito en la bibliografía, véase, por ejemplo, Physician's Desk Reference (56a ed., 2002).

#### 5.4.1.1 Malignidades de células B

También se discuten terapias que implican la administración de un anticuerpo anti-FcγRIIB, a un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano, para prevenir, tratar, gestionar o mejorar una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. Estas terapias son una mejora sobre las terapias actuales. En determinados casos, los pacientes que son refractarios a las terapias actuales pueden tratarse con los métodos de la invención. En algunos ejemplos, la terapia por administración de uno o más anticuerpos de la invención se combina con la administración de una o más terapias tales como, pero no limitadas a, quimioterapias, terapias de radiación, terapias hormonales, y/o terapias biológicas/inmunoterapias.

También se discuten protocolos de tratamiento que proporcionan mejores perfiles profilácticos y terapéuticos que las terapias con un único agente o terapias de combinación actuales para una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. Se proporcionan terapias basadas en anticuerpos frente a FcγRIIB para la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. En particular, se proporcionan protocolos profilácticos y terapéuticos para la prevención, tratamiento, gestión, mejora de una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta, que comprenden la administración de un anticuerpo específico de FcγRIIB, un análogo, derivado o un fragmento de unión a antígeno de éste a un sujeto que lo necesita.

Los anticuerpos agonistas de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de cualesquiera malignidades de células B, particularmente linfoma no de Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. Otras malignidades de células B incluyen linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt, linfomas de células del manto, linfomas de células escindidas pequeñas difusos, la mayor parte de linfomas foliculares y algunos linfomas de células B grandes difusos (DLBCL). FcγRIIB, es una diana para la desregulación por translocación cromosómica en linfoma maligno, particularmente en el linfoma de células B no de Hodgkin (Véase Callanan M.B. et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(1):309-314). Así, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar o prevenir cualquier leucemia linfocítica crónica del linaje de células B. La leucemia linfocítica crónica del linaje de células B se revisa por Freedman (Véase la revisión por Freedman, 1990, Hemtaol. Oncol. Clin. North Am. 4:405). Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo de acción, los anticuerpos agonistas de la invención inhiben o previenen malignidades de células B mediante la inhibición de la proliferación y/o activación de las células B. También se discute el uso de los anticuerpos agonistas de la invención en combinación con otras terapias conocidas (por ejemplo, quimioterapia y radioterapia) en la técnica para la prevención y/o tratamiento de malignidades de células B. Se discute además el uso de los anticuerpos agonistas de la invención en combinación con otros anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de malignidades de células B. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas de la

invención pueden usarse en combinación con los anticuerpos anti-C22 o anti-CD19 descritos por Goldenberg et al. (Patente U.S. No. 6.306.393), anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD33, o anticuerpos anti-CD52.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación, por ejemplo pero no como limitación, con Oncoscint (diana: CEA), Verluma (diana: GP40), Proscint (diana: PSMA), CEA-SCAN (diana: CEA), Rituxin (diana: CD20), Herceptin (diana: HER-2), Campath (diana: CD52), Mylotarge (diana: CD33), LymphoCide (CD22), Lymphocide Y-90 (CD22) y Zevalin (diana: CD20).

#### 5.4.2 Enfermedad autoinmune y enfermedades inflamatorias

Los anticuerpos agonistas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Se describen métodos para prevenir, tratar, o gestionar uno o más síntomas asociados con un trastorno autoinmune o inflamatorio en un sujeto, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos o fragmentos de éstos de la invención. También se proporcionan métodos para prevenir, tratar, o gestionar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprenden además administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes anti-inflamatorios. Además se proporcionan métodos para prevenir, tratar, o gestionar uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune que comprenden además administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.4.5 proporciona ejemplos no limitativos de agentes anti-inflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria. Un ejemplo no limitativo de los anticuerpos o proteínas de fusión Fc que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios se presenta en la Tabla 6A, y un ejemplo no limitativo de los anticuerpos o proteínas de fusión Fc que se usan para el tratamiento o prevención de trastornos autoinmunes se presenta en la Tabla 6B. Los anticuerpos de la invención pueden, por ejemplo, aumentar la eficacia del tratamiento de los anticuerpos terapéuticos o proteínas de fusión Fc presentados en las Tablas 6A y 6B. Por ejemplo, pero no como limitación, los anticuerpos de la invención pueden aumentar la respuesta inmune en el sujeto que se está tratando con cualquiera de los anticuerpos o proteínas de fusión Fc en las Tablas 6A ó 6B.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación, por ejemplo pero no como limitación, con Orthoclone OKT3, ReoPro, Zenapax, Simulec, Rituximab, Synagis, y Remicade.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con productos basados en dinucleótidos citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o están siendo desarrollados actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, la especificación engloba el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria para el tratamiento y/o prevención de trastornos autoinmunes o inflamatorios (Weeratna et al., 2001, FEMS Immunol Med Microbiol., 32(1):65-71).

Los ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden tratarse mediante la administración de los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, pénfigo cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada por inmunidad, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveitis, vasculitis tales como vasculitis dermatitis herpetiforme, vitiligo, y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no están limitados a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria, e inflamación crónica que resulta de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en la presente memoria en la Sección 3.1, algunos trastornos autoinmunes están asociados con una afección inflamatoria. Así, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o gestionarse según los métodos de la especificación incluyen, pero no están limitados a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no

diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria, e inflamación crónica que resulta de infecciones virales o bacterianas crónicas.

5 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar una enfermedad autoinmune que es más prevalente en un sexo. Por ejemplo, la prevalencia de la enfermedad de Graves en mujeres se ha asociado con la expresión de FcγRIIB2 (véase, Estienne et al., 2002, FASEB J. 16:1087-1092).

10 Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En un ejemplo específico, un anticuerpo reduce la inflamación en un animal al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% respecto a la inflamación en un animal al que no se administra dicho anticuerpo. En otro ejemplo, una combinación de anticuerpos reduce la inflamación en un animal al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% respecto a la inflamación en un animal al que no se administran dichos anticuerpos.

15 **Tabla 6A:** Anticuerpos para enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención.

Nombre del anticuerpo	del Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Bypass cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE



ES 2 599 319 T3

Nombre anticuerpo	del	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
BTI-322		CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571		TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	de Crohn
CDP571		TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850 Corsevin M		E-selectina Fact VII	Humanizado Quimérico		Celltech Centocor	Psoriasis Anticoagulante
D2E7		TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G		CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G		CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Ictus
IC14		CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3		ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114		CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131		CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131		CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151		CD4	Primatizado	IgG 1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152		CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/alergia
Infliximab		TNF-alfa	Quimérico	IgG 1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab		TNF-alfa	Quimérico	IgG 1	Centocor	de Crohn
LDP-01		beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Ictus
LDP-01		beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo de aloinjerto
LDP-02		alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F		TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33		CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centocor	Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4		CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507		CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis

ES 2 599 319 T3

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
Orthoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
RepPro/ Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de angioplastia coronaria
rhuMab-E25	IgE	Humanizado	IgG 1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech/Schering	Asma/alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmune
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG 1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

**Tabla 6B: Anticuerpos y proteínas de fusión Fc para trastornos autoinmunes**

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo frente al antígeno CBL en células T, células B y células NK anticuerpo completamente humano del Xenomouse
IL1-ra	artritis reumatoide	proteína anti-inflamatoria recombinante
sTNF-RI	enfermedad inflamatoria crónica artritis reumatoide	factor de necrosis tumoral soluble a - receptor de tipo I bloquea la acción de TNF
5c8 (anticuerpo Anti ligando CD-40)	Los ensayos de fase II se detuvieron en oct. 99 para examinar "eventos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado

ES 2 599 319 T3

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	psoriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (mAb anti-b7)	enfermedad inflamatoria del intestino enfermedad de Chron colitis ulcerosa	receptor de integrina $\alpha 4\beta 7$ en células sanguíneas blancas (leucocitos)
SMART Anticuerpo anti-interferón gamma	trastornos autoinmunes	Anti-interferón gamma
Verteportina	artritis reumatoide	
Talomida (talidomida)	lepra - aprobado para comercialización enfermedad de Chron artritis reumatoide	inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa)
SelCIDs (fármacos inhibidores de citoquinas selectivos)		inhibidores altamente específicos de la enzima fosfodiesterasa tipo 4 (PDE-4) incrementa los niveles de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) activa la proteína quinasa A (PKA) bloquea el factor de transcripción NK-kB previene la transcripción del gen de TNF-a disminuye la producción de TNF-a
IMiDs (fármacos inmunomoduladores)	trastornos autoinmunes generales	análogos estructurales de talidomida inhiben TNF-a
MDX-33	trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunes Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal frente a receptores FcRI
MDX-CD4	trata artritis reumatoide y otra autoinmunidad	anticuerpo monoclonal frente a la molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunes esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria del intestino lupus psoriasis	inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para preparar nuevo ARN y ADN usada en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleuquina-1 beta (enzima convertora que controla las rutas que da lugar a respuesta inmune agresiva regula citoquinas)
VX-745	específico de inflamación implicado en una señalización química de inicio de respuesta inmune y progresión de la	inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógeno P38MAP quinasa

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
	inflamación	
Enbrel (etanercept)		dirigido a TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		MAB completamente humano frente a IL-8 (interleuquina 8) (bloquea IL-8 bloquea la respuesta inflamatoria)
5G1.1	artritis reumatoide penfigoide (erupción cutánea peligrosa) psoriasis lupus	un inhibidor del complemento C5
Apogen MP4		antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas a enfermedad induce apoptosis células T eliminadas por muerte celular programada no atacan más las células propias del cuerpo apógenos específicos dirigidos a células T específicas

### 5.4.3 Alergia

Se discuten métodos para tratar o prevenir un trastornos alérgico mediado por IgE y o mediado por FcγRI en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos agonistas o fragmentos de éstos de la invención. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, los anticuerpos de la invención son útiles para inhibir la activación de mastocitos inducida por FcεRI, que contribuye a respuestas alérgicas de fase aguda y tardía (Metcalfe D. et al. 1997, *Physiol. Rev.* 77:1033). Preferiblemente, los anticuerpos agonistas de la invención tienen una eficacia terapéutica aumentada y/o efectos secundarios reducidos en comparación con los métodos convencionales usados en la técnica para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE. Los métodos convencionales para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE incluyen, pero no están limitados a, fármacos anti-inflamatorios (por ejemplo, corticosteroides orales e inhalados para el asma), antihistamínicos (por ejemplo, para rinitis alérgica y dermatitis atópica), cisteinil leucotrienos (por ejemplo, para el tratamiento del asma); anticuerpos anti-IgE; e inmunoterapia específica o desensibilización.

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

También se describen moléculas, por ejemplo, inmunoglobulinas, preparadas por ingeniería para formar complejos con FcγRI y FcγRIIB humano, es decir, se unen específicamente a FcγRI y FcγRIIB humano. Preferiblemente, dichas moléculas tienen eficacia terapéutica en trastornos mediados por IgE y FcγRI. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, la eficacia terapéutica de estas moléculas preparadas por ingeniería se debe, en parte, a su capacidad de inhibir la función de los mastocitos y basófilos.

Las moléculas que se unen específicamente a FcγRI y FcγRIIB humano pueden ser proteínas de fusión quiméricas que comprenden un sitio de unión para FcγRI y un sitio de unión para FcγRIIB. Dichas moléculas pueden prepararse por ingeniería según metodologías estándar de ADN recombinante conocidas para un experto en la técnica. Preferiblemente, una proteína de fusión quimérica para uso en los métodos de la especificación comprende una única cadena única F(ab') de un anticuerpo anti-FcγRIIB monoclonal de la invención fusionada con una región usada como un puente para unir el huFcγ a la región C terminal de la cadena única F(ab') del anticuerpo anti-FcγRIIB monoclonal. Una proteína de fusión quimérica ejemplar para uso en los métodos de la especificación comprende lo siguiente: VL/CH (FcγRIIB) - bisagra-VH/CH (FcγRIIB)-CONECTOR-CHε2-CHε3-CHε4. El conector para las moléculas quiméricas puede tener una longitud de cinco, diez, preferiblemente quince aminoácidos. La longitud del conector puede variar para proporcionar una unión óptima de la molécula tanto a FcγRIIB como a FcγRI. En una realización específica, el conector es un conector de 15 aminoácidos, que consiste en la secuencia: (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, el conector peptídico flexible facilita el emparejamiento de cadenas y minimiza el replegamiento posible y también permitirá que la molécula quimérica alcance los dos receptores, es decir, FcγRIIB y FcγRI en las células y los entrecruce. Preferiblemente, la molécula quimérica se clona en un vector de expresión de mamíferos, por ejemplo, pCI-neo, con un promotor compatible, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus. La proteína de fusión preparada según los métodos de la especificación contendrá el sitio de unión para FcεRI (CHε2CHε3) y para FcγRIIB (VL/CL,- bisagra-VH/CH). El ácido nucleico que codifica la proteína de fusión preparada según los métodos de la especificación se transfecta preferiblemente en células 293 y la proteína secretada se purifica según métodos comunes conocidos en la técnica.

La unión de las moléculas quiméricas tanto a FcεRI como FcγRIIB humano puede evaluarse usando métodos comunes conocidos para un experto en la técnica para determinar la unión a un FcγR. Preferiblemente, las moléculas quiméricas de la invención tienen eficacia terapéutica en el tratamiento de trastornos mediados por IgE, por ejemplo, mediante la inhibición de la desgranulación e inhibición de la activación celular dirigidas por antígeno.

5 La eficacia de las moléculas quiméricas de la invención en el bloqueo de la desgranulación de mastocitos mediada por FcεRI dirigida por IgE puede determinarse en ratones transgénicos, que se han preparado por ingeniería para expresar el FcεRa humano y FcγRIIB humano, antes de su uso en seres humanos.

La especificación proporciona el uso de anticuerpos biespecíficos para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE y/o mediados por FcγRI. Un anticuerpo biespecífico (BsAb) se une a dos diferentes epítomos habitualmente en distintos antígenos. Los BsAb tienen utilidad clínica potencial y se han usado para tomar como diana virus, células infectadas por virus y patógenos bacterianos así como para administrar agentes trombolíticos a coágulos sanguíneos (Cao Y., 1998 *Bioconj. Chem* 9: 635-644; Koelemij et al., 1999, *J. Immunother.*, 22, 514-524; Segal et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 558-562). La tecnología para la producción de BslgG y otras moléculas biespecíficas relacionadas está disponible (véase, por ejemplo, Carter et al., 2001 *J. of Immunol. Methods*, 248, 7-15; Segal et al., 2001, *J. of Immunol. Methods*, 248, 7-15). La presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos que contienen un F(ab') del anticuerpo anti-FcγRIIB y un F(ab') de un anticuerpo anti-hulgE monoclonal disponible que agrega dos receptores, FcγRIIB y FcεRI, en la superficie de la misma célula. Puede emplearse cualquier metodología conocida en la técnica y descrita en la presente memoria para generar anticuerpos biespecíficos para uso en los métodos de la especificación. En una realización específica, los BsAb se producirán mediante el entrecruzamiento químico de fragmentos F(ab') de un anticuerpo anti-FcγRIIB y un anticuerpo anti-hulgE como se ha escrito previamente, véase, por ejemplo, Glennie et al., 1995, *Tumor Immunobiology*, Oxford University press, Oxford, p. 225). Los fragmentos F(ab') pueden producirse por proteólisis limitada con pepsina y reducción con mercaptoetanol amina para proporcionar fragmentos Fab' con grupos sulfhidrilo (SH) libres en la región de la bisagra. El grupo SH en uno de los fragmentos Fab' (SH) puede alquilarse con exceso de 0-fenilendimaleimida (0-PDM) para proporcionar un grupo maleimida (mal) libre. Las dos preparaciones Fab'(mal) y Fab'(SH) pueden combinarse a una proporción apropiada, preferiblemente 1:1 para generar construcciones heterodiméricas. Los BsAb pueden purificarse por cromatografía de exclusión por tamaño y caracterizarse por HPLC usando métodos conocidos para un experto en la técnica.

En particular, la invención engloba anticuerpos biespecíficos que comprenden una primera pareja cadena pesada-cadena ligera que se une a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicha pareja cadena pesada-cadena ligera se une a FcγRIIA, y una segunda pareja cadena pesada-cadena ligera que se une al receptor de IgE, con la condición de que dicha primera pareja cadena pesada-cadena ligera se une a FcγRIIB en primer lugar. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden prepararse por ingeniería usando técnicas estándar conocidas en la técnica para asegurar que la unión a FcγRIIB precede la unión al receptor de IgE. Un experto en la técnica entenderá preparar por ingeniería los anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, de manera que dichos anticuerpos biespecíficos se unan a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dichos anticuerpos se unen al receptor de IgE. Adicionalmente, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse por ingeniería por técnicas conocidas en la técnica, de manera que el tamaño de la bisagra del anticuerpo pueda incrementarse en longitud, por ejemplo, añadiendo conectores, para proporcionar a los anticuerpos biespecíficos flexibilidad para unirse al receptor de IgE y receptor FcγRIIB en la misma célula.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con otros anticuerpos o fármacos terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualquiera de los siguientes: azelastina, Astelina, inhalador de dipropionato de beclometasona, Vanceril, inhalador/pulverizador nasal de dipropionato de beclometasona, Vancenasa, inhalador/pulverizador nasal de Beconase budesonida, Rhinocort cetirizina, Zyrtec clorfeniramina, pseudoefedrina, Deconamina, Sudafed, cromolina, Nasalcrom, Intal, Opticrom, desloratadina, Clarinex, fexofenadina y pseudoefedrina, Allegra-D, fexofenadina, pulverizador nasal de Allegra flunisolida, inhalador/pulverizador nasal de Nasalida propionato de fluticasona, inhalador oral de Flonase propionato de fluticasona, Flovent, hidroxizina, Vistaril, Ataraxloratadina, pseudoefedrina, Claritina-D, loratadina, Claritina, prednisolona, Prednisolona, líquido oral Pediapred, Medrol prednisona, Deltasona, Predsalmeterol líquido, inhalador de Serevent triamcinolona acetona, inhalador/pulverizador nasal de Azmacort triamcinolona acetona, Nasacort, o NasacortAQ. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con productos basados en dinucleótidos citosina-guanina ("CpG") que han sido desarrollados (Coley Pharmaceuticals) o están siendo desarrollados actualmente como activadores de respuestas inmunes innatas y adquiridas. Por ejemplo, también se discute el uso de CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) en los métodos y composiciones de la especificación para el tratamiento y/o prevención de trastornos alérgicos mediados por IgE (Véase, también, Weeratna et al., 2001, *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 32(1):65-71).

Además se describe el uso de los anticuerpos de la invención en combinación con cualesquiera anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de trastornos alérgicos, por ejemplo, Xolair™ (Omalizumab; Genentech); rhuMAB-E25 (BioWorld Today, Nov. 10, 1998, p. 1; Genentech); CGP-51901 (anticuerpo anti-IgE humanizado), etc.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con otras composiciones conocidas

en la técnica para el tratamiento de trastornos alérgicos. En particular, los métodos y composiciones descritos en Carson et al.. (US 6.426.336; US 2002/0035109 A1; US 2002/0010343).

#### 5.4.4 Agentes inmunomoduladores y agentes anti-Inflamatorios

5 También se describen métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de los anticuerpos de la presente invención conjuntamente con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no están limitados a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetil, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloaminadas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de células T, y moduladores del receptor de citoquinas.

10 Los agentes anti-inflamatorios han tenido éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes y ahora son comunes y un tratamiento estándar para dichos trastornos. Cualquier agente anti-inflamatorio muy conocido para un experto en la técnica puede usarse en los métodos de la especificación. Los ejemplos no limitativos de agentes anti-inflamatorios incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), fármacos anti-inflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos, y metil xantinas. Los ejemplos de NSAID incluyen, pero no están limitados a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), quetoralac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), quetoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos NSAID funcionan mediante la inhibición de una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos anti-inflamatorios esteroideos incluyen, pero no están limitados a glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina, y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos.

#### 5.4.5 Agentes anti-cancerosos y anticuerpos terapéuticos

25 Además se describe la administración de uno o más inhibidores de la angiogénesis tales como pero no limitados a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénico; angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefina; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartilago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); bloqueantes/inhibidores de EGFR (Iressa®, Tarceva®, Erbitux®, y ABX-EGF); fragmentos de fibronectina; Gro-beta; halofuginona; heparinasas; fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleuquina-12; krigle 5 (fragmento de plasminógeno); marimastat; inhibidores de metaloproteínasa (TIMP); 2-mehoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa de placenta; inhibidor del activador de plasminógeno; factor de plaquetas 4 (PF4); prinomastat; fragmento de 16kD 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 transformante beta (TGF-β); vasculostatina; vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.

40 Los agentes anti-cancerosos que pueden usarse con anticuerpos de la invención en los varios casos de la especificación, incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la especificación, incluyen, pero no están limitados a: acivicina; aclarubicina; hidrocloruro de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; hidrocloruro de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; hidrocloruro de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidrocloruro de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina hidrocloruro de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrocloruro de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; hidrocloruro de epirubicina; erbulozol; hidrocloruro de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; hidrocloruro de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sodio; gemcitabina; hidrocloruro de gemcitabina; hidroxiiurea; hidrocloruro de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleuquina II (incluyendo interleuquina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatino; hidrocloruro de irinotecán; acetato de lanreótido; letrozol; acetato de leuprolida; hidrocloruro de liarozol; lometrexol sodio; lomustina; hidrocloruro de losoxantrona; masoprocol; maitansina; hidrocloruro de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sodio; metoprina; metureda; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano hidrocloruro de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino oxisurá paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfán; hidrocloruro de

piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sodio; porfiromicina; prednimustina; hidroclicloruro de procarbazona; puomicina; hidroclicloruro de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; hidroclicloruro de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; hidroclicloruro de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; hidroclicloruro de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; hidroclicloruro de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreótido; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; hidroclicloruro de zorrubicina. Otros fármacos anti-cancerosos incluyen, pero no están limitados a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelido; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastán; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de campotecina; IL-2 de viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartilago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cisporfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshiodridemina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristérico; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterido; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidroclicloruro de fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunostimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1; agonistas de interferón; interferones; interleuquinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinólido; kahalalido F; triacetato de lamelarina-N; lanreótido; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatino; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa de leucocito; leuprólido+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtoteán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de la metaloproteínasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; nulfefosina; mirimostim; ARN bicatenario con emparejamiento erróneo; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A+extracto de la pared celular de micobacterias; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor de tumor múltiple 1; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; napferpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante nítrido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreótido; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citoquinas; ormaplatino osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos del paclitaxel; derivados del paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosán polisulfato sodio; pentostatina; pentozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perfílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; hidroclicloruro de pilocarpina; pirarrubicina; pirtrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, de microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina polioxiétileno piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la proteína transferasa de farnesilo ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; roglitimida; rohituquina; romurtido; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos con sentido;

inhibidores de la transducción de la señal; moduladores de la transducción de la señal; proteína de unión a antígeno de cadena única; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámidas; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; tamoxifen metioduro; taumustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante del tiroides; estaño etil etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterido; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vaporeótido; variolina B; sistema de vector, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalamer. Los fármacos anti-cancerosos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) que es un anticuerpo anti-HER2 monoclonal humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un anti-receptor de glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo anti-CD25 monoclonal humanizado inmunosupresor para la prevención de rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ (edrecolomab) que es un anticuerpo IgG2a murino anti-antígeno 17-IA de la superficie celular (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG murino anti-idiotipo (epitopo GD3) (ImClone System); Erbitux® (cetuximab) que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo anti-integrina αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo IgG1 anti CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ (rituximab) que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ (epratuzumab) que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 que es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 que es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ que es un anticuerpo murino anti-CD20 radiomarcado (IDEC/Schering AG); IDEC-131 que es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 que es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 que es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 que es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 que es un anticuerpo anti-factor 5 de complemento humanizado (C5) (Alexion Pharm); Humira® que es un anticuerpo anti-TNF-α humano (Abbott Laboratories); CDP870 que es un anticuerpo anti-fragmento Fab de TNF-α humanizado (Celltech); IDEC-151 que es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 que es un anticuerpo IgG4 anti-TNF-α humanizado (Celltech); LDP-02 que es un anticuerpo anti-α4β7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ que es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ que es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 que es un anticuerpo anti-TGF-β<sub>2</sub> humano (Cambridge Ab Tech).

Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7: Anticuerpos monoclonales para terapia de cáncer que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la invención.**

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	Receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pentumomabitrío-	cáncer de ovario	antígeno



ES 2 599 319 T3

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	90)		PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	blvatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	ictus isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAB, 105AD7 idiopático	vacuna para el cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	MAB, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptina	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptina	cáncer de mama en estadio temprano	HER-2
	Rituxan	NHL recidivante/refractario de bajo grado o folicular	CD20
	Rituxan	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	MAB-VEGF	Cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	AMD Fab	degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26 (2ª gen. IgE)	asma y rinitis alérgicos	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	grado bajo de NHL de células B folicular, recidivante o refractario, positivo para CD20 y NHL refractario para Rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecán	carcinoma colorrectal refractario	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente	Receptor de EGF
	Cetuximab + gemcitabina	carcinoma pancreático metastásico recién diagnosticado	Receptor de EGF

ES 2 599 319 T3

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	Receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas recién diagnosticado	Receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad extensa incurable local-regional y metástasis distantes)	Receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado	Receptor de EGF
	BEC2 + Bacilo de Calmette Guerin	carcinoma de pulmón de células pequeñas	miméticos de gangliósido GD3
	BEC2 + Bacilo de Calmette Guerin	melanoma	miméticos de gangliósido GD3
	IMC-1C11	cáncer colorrectal con metástasis hepáticas	receptor de VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	cáncer colorrectal, gástrico, y pancreático	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no de Hodgkins	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no de Hodgkins	CD22
	CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de mama (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (radio imagen)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección de tejido blando (radioimagen)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfomas (radioimagen)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres de línea germinal hígado 7 (radioimagen)	AFP

ES 2 599 319 T3

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	imagen colorrectal	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	cánceres de próstata y otros	CTLA-4
	MDX-210 (sobrexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxina	Cáncer	$\alpha\beta 3$
Merck KGaA	MAB 425	Varios cánceres	Receptor de EGF
	IS-IL-2	Varios cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-streptavidina (+ biotina-itrio 90)	Linfoma no de Hodgkins	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no de Hodgkins	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno no reseccionable	Proteínas asociadas al ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina staphylococcal)	cáncer pancreático	NA
	MAB, cáncer de pulmón/riñón	cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolomab tafenatox (C242 + enterotoxina staphylococcal)	cáncer de colon y pancreático	NA
Protein Design Labs	Nuvion	malignidades de células T	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	GD2-gangliósido

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas	GD2-gangliósido
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado	Linfoma no de Hodgkins	NA
	Monopharm C	carcinoma colorrectal y pancreático	Antígeno SK-1
	GlioMAb-H (+ toxina gelonina)	glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL recidivante/refractario de bajo grado o folicular	CD20
	Rituxan	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

#### 5.4.6 Terapia de vacuna

5 Se describe un método para aumentar una respuesta inmune a una composición de vacuna en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto un anticuerpo o un fragmento de éste que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, y una composición de vacuna, en el que dicho anticuerpo o un fragmento de éste aumenta la respuesta inmune a dicha composición de vacuna. Dicho anticuerpo o un fragmento de éste puede aumentar la respuesta inmune a dicha composición de vacuna aumentando la presentación de antígeno y/o el procesamiento del antígeno frente al que está dirigida la vacuna. Cualquier composición de vacuna conocida en la técnica es útil en combinación con los anticuerpos o fragmentos de éstos de la invención.

10 Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier vacuna de cáncer conocida en la técnica, por ejemplo, Canvaxin™ (Cancer Vax, Corporation, melanoma y cáncer de colon); Oncophage (HSPPC-96; Antigenics; melanoma metastásico); vacuna de cáncer HER-2/neu, etc. Las vacunas de cáncer usadas en los métodos descritos en la presente memoria y composiciones de la invención pueden ser, por ejemplo, vacunas específicas de antígeno, vacunas anti-idiotípicas, vacunas de células dendríticas, vacunas de ADN. También se describe el uso de los anticuerpos de la invención con vacunas basadas en células como se describe por Segal et al. (Patente U.S. No. 6.403.080). Las vacunas basadas en células en combinación con los anticuerpos de la invención pueden ser bien autólogas o alogénicas. Brevemente, las vacunas basadas en cáncer como se describe por Segal et al. se basan en el producto Oponokine (TM) por Genitrix, LLC. Las Oponokines(TM) son citoquinas preparadas por ingeniería genética que, cuando se mezclan con células tumorales, se unen automáticamente a la superficie de las células. Cuando las células "decoradas" se administran como una vacuna, la citoquina en las células activa las células presentadoras de antígeno en el receptor, mientras también permite que las células presentadoras de antígeno ingieran las células tumorales. Las células presentadoras de antígeno son entonces capaces de instruir a células T "asesinas" para encontrar y destruir células tumorales similares a lo largo del cuerpo. Así, el producto de Oponokine(TM) convierte a las células tumorales en un inmunoterapéutico anti-tumoral potente.

15 Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier vacuna de alergia conocida en la técnica. Los anticuerpos de la invención pueden usarse, por ejemplo, en combinación con moléculas híbridas recombinantes que codifican los alérgenos principales de polen de hierba timotea usados para la vacunación frente a la alergia al polen de hierba, como se describe por Linhart et al. (2000, FASEB Journal, 16(10):1301-3). Además, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con vacunaciones basadas en ADN descritas por Horner et al. (2002, Allergy, 57 Supl, 72:24-9). Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con vacunación con el bacilo de Clamett-Guerin ("BCG") como se describe por Choi et al. (2002, Ann. Allergy Asthma Immunology, 88(6): 584-91) y Barlan et al. (2002, Journal Asthma, 39(3):239-46) para regular a la baja la secreción

de IgE. Los anticuerpos de la invención son útiles para tratar alergias alimentarias. En particular, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con vacunas u otras inmunoterapias conocidas en la técnica (véase Hourihane et al., 2002, Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2(3):227-31) para el tratamiento de alergias al cacahuete.

5 Los métodos descritos en la presente memoria y las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con vacunas, en las que se desea la inmunidad para el o los antígenos. Dichos antígenos pueden ser cualquier antígeno conocido en la técnica. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para aumentar una respuesta inmune, por ejemplo, frente a agentes infecciosos, células enfermas o anormales tales como, pero no limitadas a, bacterias (por ejemplo, bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, bacterias aeróbicas, Spirochetes, Mycobacteria, Rickettsias, Chlamydias, etc.), parásitos, hongos (por ejemplo, Candida albicans, Aspergillus, etc.), virus (por ejemplo, virus con ADN, virus con ARN, etc.), o tumores. Las infecciones virales incluyen, pero no están limitadas a, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, u otros virus de hepatitis; citomagalovirus, virus del herpes simple-1 (-2,-3,-4,-5,-6), virus de papiloma humano; virus sincitial respiratorio (RSV), virus parainfluenza (PIV), virus de Epstein Barr, metaneumovirus humano (HMPV), virus influenza, síndrome respiratorio agudo severo (SARS) o cualesquiera otras infecciones virales.

También se discuten métodos y composiciones de vacuna que comprenden combinaciones de un anticuerpo de la invención, un antígeno y una citoquina. Preferiblemente, la citoquina es IL-4, IL-10, o TGF- $\beta$ .

También se discute el uso de los anticuerpos de la invención para aumentar una respuesta humoral y/o mediada por células frente al o los antígenos de la composición de vacuna, así como el uso de los anticuerpos de la invención bien para prevenir o tratar un trastorno particular, en el que una respuesta inmune aumentada frente a un antígeno o antígenos particulares es efectiva para prevenir o tratar la enfermedad o trastorno. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, pero no están limitados a, infecciones virales, tales como VIH, CMV, hepatitis, virus del herpes, sarampión, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y parasitarias, cánceres, y cualquier otra enfermedad o trastorno factible de tratamiento o prevención mediante el aumento de una respuesta inmune frente a un antígeno o antígenos particulares.

### 5.5 Composiciones y métodos de administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención. Específicamente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describen métodos para el tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una proteína de fusión o molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o moléculas conjugadas de la invención. Se prefiere que un anticuerpo o proteína de fusión o molécula conjugada, esté sustancialmente purificada (es decir, que carezca sustancialmente de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). Específicamente, el sujeto puede ser un animal, preferiblemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, un mono tal como un mono cinomolgus y un ser humano. Se prefiere que el sujeto sea un ser humano.

En la técnica se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar una composición que comprende anticuerpos de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

En algunos casos, los anticuerpos de la invención se formulan en liposomas para la administración dirigida de los anticuerpos de la invención. Los liposomas son vesículas comprendidas por bicapas de fosfolípidos ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. Los liposomas comprenden típicamente varios tipos de lípidos, fosfolípidos, y/o tensioactivos. Los componentes de los liposomas se organizan en una configuración de bicapa, similar a la organización de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas son vehículos de administración particularmente preferidos debido, en parte, a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad, y baja toxicidad. Los métodos para la preparación de liposomas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; Patentes U.S. Nos. 4.485.045 y 4.544.545.

También se describen métodos para preparar liposomas con una vida media en suero prolongada, es decir, tiempo de circulación aumentado, tal como se describe en la Patente U.S. No. 5.013.556. Los liposomas preferidos usados en los métodos descritos en la presente memoria no se aclaran rápidamente de la circulación, es decir, no son captados en el sistema de fagocitos mononuclear (MPS). Pueden usarse liposomas estéricamente estabilizados que se preparan usando métodos comunes conocidos para un experto en la técnica. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, los liposomas estéricamente estabilizados contienen componentes lipídicos con restos hidrofílicos voluminosos y altamente flexibles, que reduce la reacción no deseada

de los liposomas con proteínas séricas, reduce la opsonización con componentes séricos y reduce el reconocimiento por MPS. Los liposomas estéricamente estabilizados se preparan preferiblemente usando polietileno glicol. Para la preparación de liposomas y liposomas estéricamente estabilizados véase, por ejemplo, Bendas et al., 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215-224; Allen et al., 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klivanov et al., 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235-7; Blum et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger et al., 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; Maruyama et al., 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klivanov et al., 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen et al., 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13: 285-309. Los liposomas que están adaptados para direccionamiento a órganos específicos, véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.544.545, o direccionamiento a células específicas, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0074403 también pueden usarse. Los liposomas particularmente útiles para uso en las composiciones de la invención y los métodos descritos en la presente memoria pueden generarse por el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. En algunos casos, un fragmento de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, F(ab'), puede conjugarse con los liposomas usando métodos descritos previamente, véase, por ejemplo, Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288.

Los anticuerpos de la invención también pueden formularse como inmunoliposomas. Inmunoliposomas se refiere a una composición liposomal, en la que un anticuerpo de la invención o un fragmento de éste se une, covalentemente o no covalentemente, a la superficie liposomal. La química de la unión de un anticuerpo a la superficie liposomal se conoce en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.787.153; Allen et al., 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-44. Se prefiere que los inmunoliposomas para uso en los métodos descritos en la presente memoria y composiciones de la invención estén además estéricamente estabilizados. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen covalentemente o no covalentemente a un anclaje hidrofóbico, que está insertado de forma estable en la bicapa lipídica del liposoma. Los ejemplos de anclajes hidrofóbicos incluyen pero no están limitados a fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI). Para conseguir una unión covalente entre un anticuerpo y un anclaje hidrofóbico, puede usarse cualquiera de las estrategias bioquímicas conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, J. Thomas August, ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volumen 40, Academic Press, San Diego, CA., p. 399-435, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Por ejemplo, un grupo funcional en una molécula de anticuerpo puede reaccionar con un grupo activo en un anclaje hidrofóbico asociado a liposoma, por ejemplo, un grupo amino de una cadena lateral de lisina en un anticuerpo puede acoplarse a N-glutarilfosfatidiletanolamina asociada a liposoma activada con carbodiimida soluble en agua; o un grupo tiol de un anticuerpo reducido puede acoplarse a liposomas mediante anclajes reactivos con tiol tales como piridilpropionilfosfatidiletanolamina. Véase, por ejemplo, Dietrich et al., 1996, *Biochemistry*, 35: 1100-1105; Loughrey et al., 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 901: 157-160; Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288; Martin et al., 1981, *Biochemistry*, 20: 4429-38. Aunque no se pretende la vinculación a ningún mecanismo particular de acción, las formulaciones inmunoliposomales que comprenden un anticuerpo de la invención son particularmente efectivas como agentes terapéuticos, ya que administran el anticuerpo al citoplasma de la célula diana, es decir, la célula que comprende el receptor FcγRIIB al que se une el anticuerpo. Los inmunoliposomas tienen preferiblemente una vida media en sangre incrementada, específicamente células diana, y pueden internalizarse en el citoplasma de las células diana evitando de esta manera la pérdida o degradación del agente terapéutico por la ruta endolisosomal.

Se describe un anticuerpo de la invención o un fragmento de éste. Los inmunoliposomas pueden comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los descritos en la presente memoria.

Las composiciones inmunoliposomales descritas en la presente memoria comprenden uno o más lípidos formadores de vesículas, un anticuerpo de la invención o un fragmento o derivado de éste, y opcionalmente un polímero hidrofílico. Un lípido formador de vesículas es preferiblemente un lípido con dos cadenas hidrocarbonadas, tales como cadenas acilo y un grupo de cabeza polar. Los ejemplos de lípidos formadores de vesículas incluyen fosfolípidos, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, esfingomiélin, y glicolípidos, por ejemplo, cerebrósidos, gangliósidos. Las composiciones inmunoliposomales pueden comprender además un polímero hidrofílico, por ejemplo, polietileno glicol, y gangliósido GM1, que incrementa la vida media en suero del liposoma. Los métodos para conjugar polímeros hidrofílicos a liposomas son muy conocidos en la técnica y están englobados en la invención. Para una revisión de inmunoliposomas y métodos para prepararlos, véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0044407; Publicación Internacional PCT No. WO 97/38731, Vingerhoads et al., 1994, *Immunomethods*, 4: 259-72; Maruyama, 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23(7): 791-799; Abra et al., 2002, *Journal of Liposome Research*, 12(1 y 2): 1-3; Park, 2002, *Bioscience Reports*, 22(2): 267-281; Bendas et al., 2001 *BioDrugs*, 14(4): 215-224, J. Thomas August, ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volumen 40, Academic Press, San Diego, CA., p. 399-435.

Los métodos para administrar un anticuerpo de la invención incluyen, pero no están limitados a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (por ejemplo, rutas intranasal y oral). Se prefiere que los anticuerpos de la invención se administren intramuscularmente, intravenosamente, o subcutáneamente. Las composiciones pueden administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de los recubrimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros

agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos, 6,019.968; 5.985. 20; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las Publicaciones PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La invención también proporciona que los anticuerpos de la invención se envasen en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de anticuerpo. Los anticuerpos de la invención pueden suministrarse como un polvo liofilizado seco esterilizado o concentrado sin agua en un contenedor herméticamente sellado y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o disolución salina hasta la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se suministran como un polvo liofilizado seco estéril en un contenedor herméticamente sellado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, o al menos 75 mg. Los anticuerpos de la invención liofilizados deben almacenarse entre 2 y 8°C en su contenedor original y los anticuerpos deben administrarse en las 12 horas, preferiblemente en las 6 horas, en las 5 horas, en las 3 horas, o en la 1 hora después de la reconstitución. Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden suministrarse en forma líquida en un contenedor herméticamente sellado indicando la cantidad y concentración del anticuerpo, proteína de fusión, o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de los anticuerpos se suministra en un contenedor herméticamente sellado al menos 1 mg/ml, más preferiblemente 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 los anticuerpos.

La cantidad de la composición de la invención que será efectiva en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse por técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad de la afección, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o modelos animales.

Para los anticuerpos englobados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es 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 ó 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune frente a los polipéptidos extraños. Así, frecuentemente es posible dosificaciones menores de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación y frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención o fragmentos de éstos puede reducirse aumentando la captación y la penetración en los tejidos de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

La dosificación de los anticuerpos de la invención administrada a un paciente puede ser 0,01 mg a 1.000 mg/día, cuando se usa como terapia de un único agente. Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es menor que cuando dichos anticuerpos se usan como terapia de un único agente.

Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo, y no como limitación, por infusión local, por inyección, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales a los que no se absorba el anticuerpo o la proteína de fusión.

Las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, p. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, p. 3 17-327; véase generalmente *ibid.*).

Las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida para un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.526.938; Publicación PCT WO 91/05548; Publicación PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. Puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (Véase, Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; y Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). Pueden usarse materiales poliméricos para conseguir la liberación

controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Patente U.S. No. 5.679.377; Patente U.S. No. 5.916.597; Patente U.S. No. 5.912.015; Patente U.S. No. 5.989.463; Patente U.S. No. 5.128.326; Publicación PCT No. WO 99/15154; y Publicación PCT No. WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no están limitados a, poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poli(acrilamida), poli(etileno glicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. Un sistema de liberación controlada puede ponerse en la proximidad de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, p. 115-138 (1984)). Las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan según Dunn et al. (Véase U.S. 5.945.155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema de polímero. El implante puede ocurrir generalmente en cualquier lugar en el cuerpo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. Puede usarse un sistema de administración sostenido no polimérico, mediante el cual un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se usa como sistema de administración del fármaco. Después del implante en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará, o se liberará de la composición en el fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz sólida microporosa (Véase U.S. 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990, Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida para un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.526.938; Publicaciones Internacionales Nos. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

Cuando la composición de la especificación es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para estimular la expresión de su anticuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que sea intracelular, por ejemplo, por el uso de un vector retroviral (Véase, la Patente U.S. No. 4.980.286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en un unión a un péptido semejante a caja homeótica que se sabe que entra en el núcleo (Véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para expresión por recombinación homóloga.

Para los anticuerpos, la dosificación terapéuticamente o profilácticamente efectiva administrada a un sujeto es típicamente 0,1 mg/kg a 200 mg/kg del peso corporal del sujeto. Preferiblemente, la dosificación administrada a un sujeto es entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto y más preferiblemente la dosificación administrada a un sujeto es entre 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosificación y frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención también puede reducirse aumentando la captación y la penetración en los tejidos (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o proteína de fusión por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de anticuerpos de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con anticuerpos de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5, ó 6 semanas. En otros ejemplos, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En más ejemplos adicionales, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación efectiva de los anticuerpos usados para el tratamiento puede incrementarse o disminuirse durante el curso de un tratamiento particular.

### 5.5.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. Dichas composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en la presente memoria o una



combinación de los agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de anticuerpos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización particular que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de éste que se une a FcγRIIB con una mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o un fragmento de éste se une a FcγRIIA, un anticuerpo citotóxico que se une específicamente a un antígeno de cáncer, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización que se encuentra en el alcance de las reivindicaciones especificadas, dicha composición farmacéutica comprende además uno o más agentes anti-cancerosos.

10 En un caso específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la Farmacopea de los EEUU u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente, o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las disoluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno glicol, agua, y etanol. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida.

25 Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran bien separadamente o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición es para administrarse como infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o disolución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua o disolución salina para inyección estéril de manera que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a las formadas con aniones tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

35 La presente especificación también proporciona composiciones farmacéuticas y kits que comprenden un antagonista de FcγRIIB para uso en la prevención, tratamiento, gestión, o mejora de una malignidad de células B, o uno o más síntomas de ésta. En particular, la presente especificación proporciona composiciones farmacéuticas y kits que comprenden un antagonista de FcγRIIB, un análogo, derivado o un anticuerpo anti-FcγRIIB o un fragmento de unión a antígeno de éste.

#### 40 **5.5.2 Terapia génica**

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o proteínas de fusión, pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o infección, mediante terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que se puede expresar. Los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificado que media un efecto terapéutico o profiláctico.

En la presente memoria se puede usar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. Los métodos ejemplares se describen a continuación.

50 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215; y Scholl, 2003, *J. Biomed Biotechnol* 2003:35-47. Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); NY; y Krieglger, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

55 Una composición de la especificación puede comprender ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, siendo parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos de forma operativa a la región codificadora del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente,

específico de tejido. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificadoras del anticuerpo y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que estimulan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

Una composición de la especificación puede comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, siendo una parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, unidos de forma operativa a la región codificadora de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otro caso particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificadora de la proteína de fusión y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que estimulan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión.

La administración de los ácidos nucleicos en un sujeto puede ser bien directa, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o vectores que portan el ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan en el sujeto. Estas dos estrategias se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácido nucleico pueden administrarse directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolas de manera que sea intracelular, por ejemplo, por infección usando vectores retrovirales defectivos o atenuados u otros vectores virales (véase, la Patente U.S. No. 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o por recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolas en unión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolas en unión con un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (Véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que puede usarse para tomar como diana tipos celulares que expresan específicamente los receptores), etc. Pueden formarse complejos ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. El ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para captación y expresión específica de célula, tomando como diana un receptor específico (Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente No. 2005/0002903; Publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

Pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (Véase, Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se va a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos en un sujeto. Más detalles acerca de los vectores retrovirales pueden encontrarse en Boesen et al., (1994, Biotherapy 6:291-302), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen de *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales, y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se están dividiendo. Kozarsky y Wilson (Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503, 1993, presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., (Human Gene Therapy, 5:3-10, 1994) demuestran el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; Publicación PCT WO94/12649; y Wang et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783. Se prefiere usar vectores adenovirus.

Los virus adeno-asociados (AAV) también se han propuesto para uso en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y la Patente U.S. No. 5.436.146).

Otra estrategia para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular por métodos tales como

electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se ponen bajo selección para aislar aquellas células que han tomado y están expresando el gen transferido. Estas células se administran entonces a un sujeto.

- 5 El ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica mediada por microcell, fusión de esferoblastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en células (Véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; y Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985) y pueden usarse según la presente especificación, con la condición de que no se interrumpen las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico se puede expresar por la célula y preferiblemente es hereditario y se puede expresar por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto por varios métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) se administran preferiblemente intravenosamente. La cantidad de células que considera para uso depende del efecto deseado, estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

- 20 Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para los propósitos de terapia génica engloban cualquier tipo celular disponible deseado, e incluyen pero no está limitado a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; varas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, como se obtienen de la médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

Preferiblemente, la célula usada para terapia génica es autóloga para el sujeto.

- En un ejemplo en el que se usan células recombinantes en terapia génica, se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión en las células de manera que se pueden expresar por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran entonces *in vivo* para efecto terapéutico. En un ejemplo específico, se usan células madre o progenitoras. Cualesquiera células madre y/o progenitoras que pueden aislarse y mantenerse *in vitro* pueden usarse potencialmente como se describe en la presente memoria (Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 7 1:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

- 35 El ácido nucleico que puede introducirse para los propósitos de terapia génica comprende un promotor inducible unido de forma operativa a la región codificadora, de manera que la expresión del ácido nucleico se puede controlar controlando la presencia o ausencia del inductor apropiado de la transcripción.

### 5.5.3 Kits

- También se describe un envase farmacéutico o kit que comprende uno o más contenedores llenos con anticuerpos de la invención. Adicionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden estar incluidos en el envase farmacéutico o kit. También se describe un envase farmacéutico o kit que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado con dicho o dichos contenedores, puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, nota que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

- También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. Un kit puede comprender uno o más anticuerpos de la invención. Un kit puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer, en uno o más contenedores. Un kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos de cáncer asociados con cáncer. El otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un quimioterapéutico. El agente profiláctico o terapéutico puede ser un terapéutico biológico u hormonal.

### 5.6 Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica

- Varios aspectos de las composiciones farmacéuticas o agentes profilácticos o terapéuticos de la especificación se ensayan preferiblemente *in vitro*, por ejemplo, en un sistema de cultivo celular, y después *in vivo*, por ejemplo, en un organismo de modelo animal, tal como un sistema de modelo animal en roedores, para la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica está indicada, incluyen ensayos de cultivo celular en los

que se crece en cultivo una muestra de tejido de un paciente, y se expone a o se pone en contacto de otra manera con una composición farmacéutica, y se observa el efecto de dicha composición en la muestra de tejido, por ejemplo, inhibición de o disminución del crecimiento y/o formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en membrana de basamento tridimensional o preparación de matriz extracelular. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Este ensayo permite la identificación de la o las moléculas profilácticas o terapéuticas más terapéuticamente efectivas para cada paciente individual. Alternativamente, en lugar de cultivar células de un paciente, los agentes terapéuticos y métodos pueden cribarse usando células de una línea celular tumoral o maligna. En varios casos específicos, los ensayos *in vitro* pueden llevarse a cabo con células representativas de tipos celulares implicados en un trastorno autoinmune o inflamatorio (por ejemplo, células T), para determinar si una composición farmacéutica de la invención tiene un efecto deseado en dichos tipos celulares. Pueden usarse muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, por recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul de tripán, la diferenciación puede evaluarse visualmente sobre la base de cambios en la morfología, crecimiento disminuido y/o formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en membrana de basamento tridimensional o preparación de matriz extracelular, etc. Los ensayos adicionales incluyen asociación de balsas, CDC, ADCC y ensayos de apoptosis como se conoce en la técnica y se describe en los Ejemplos.

Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden ensayarse en sistemas de modelo animal adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelo animal incluyen, pero no están limitados a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal muy conocido en la técnica. Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden ensayarse en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas de modelo se usan ampliamente y son muy conocidos para el experto en la técnica. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar tal como el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes se administran separadamente o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos para uso en los métodos descritos en la presente memoria son por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR en células efectoras de ratón, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en la Patente U.S. No. 5.877.396. Los ratones transgénicos para uso en los métodos descritos en la presente memoria incluyen pero no están limitados a ratones que portan FcγRIIIA humano, ratones que portan FcγRIIA humano, ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano, ratones que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano.

Una vez los agentes profilácticos y/o terapéuticos descritos en la presente memoria se han ensayado en un modelo animal pueden ensayarse en estudios clínicos para establecer su eficacia. El establecimiento de estudios clínicos se hará según las metodologías comunes conocidas para un experto en la técnica, y las dosificaciones y rutas de administración óptimas así como perfiles de toxicidad de las composiciones de la invención pueden establecerse usando experimentación rutinaria.

La actividad anti-inflamatoria de las terapias de combinación descritas en la presente memoria puede determinarse usando varios modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al.(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). Los modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes también pueden usarse para evaluar la actividad anti-inflamatoria de las terapias de combinación descritas. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.

Los modelos animales principales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y usados ampliamente incluyen: modelos de rata de artritis inducida por adyuvante, modelos de rata y ratón de artritis inducida por colágeno, y modelos de de rata, conejo y hámster de artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L.J. y Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty et al.(eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).

La actividad anti-inflamatoria de las terapias de combinación descritas en la presente memoria puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenano. La artritis inducida por carragenano también se ha usado en conejo, perro y cerdo en estudios de artritis o inflamación crónica. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se usa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para usar dicho modelo de artritis inducida por carragenano se describen en Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat," *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se usan comúnmente los modelos animales de inflamación inducida por zimósán como se conoce y describe en la técnica.

La actividad anti-inflamatoria de las terapias de combinación descritas en la presente memoria también puede evaluarse midiendo la inhibición del edema en la pata inducido por carragenano en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. et al., "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se ha usado como un cribado

primario *in vivo* para la actividad anti-inflamatoria de la mayor parte de los NSAID, y se considera predictiva de eficacia en seres humanos. La actividad anti-inflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos de ensayo se expresa como el porcentaje de inhibición del incremento en el peso de la pata trasera del grupo de ensayo respecto al grupo control dosificado con vehículo.

5 Adicionalmente, también pueden usarse modelos animales para enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas en la presente memoria (Kim et al., 1992, Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober, 1985, Dig. Dis. Sci. 30(12 Supl):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que pueden inducirse en animales. Los polisacáridos sulfatados  
10 incluyendo, pero no limitado a amilopectina, carragenano, sulfato de amilopectina, y sulfato de dextrano o los irritantes químicos incluyendo pero no limitado a ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a animales oralmente para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.

Los modelos animales para asma también pueden usarse para evaluar la eficacia de las terapias de combinación descritas. Un ejemplo de dicho modelo es el modelo de transferencia adoptiva murina en el que la provocación con  
15 aeroalérgeno de ratones receptores TH1 o TH2 resulta en la migración de las células efectoras TH a las vías aéreas y se asocia con una respuesta inflamatoria de la mucosa pulmonar intensa neutrofílica (TH1) y eosinofílica (TH2) (Cohn et al., 1997, J. Exp. Med. 186:1737-1747).

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

Además, cualesquiera ensayos conocidos para los expertos en la técnica pueden usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la presente memoria para enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente especificación pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por  
25 ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan altos índices terapéuticos. Aunque los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan efectos  
30 secundarios tóxicos pueden usarse, debe tenerse cuidado en el diseño de un sistema de administración que dirige a dichos agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso en seres humanos.  
35 La dosificación de dichos agentes se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la especificación, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en  
40 plasma que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición de síntomas mitad de la máxima) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

La actividad anti-cancerosa de las terapias usadas según la presente especificación también puede determinarse usando varios modelos animales experimentales para el estudio del cáncer tales como el modelo de ratón SCID o  
45 ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig y Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven y Winograd); y Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher).

Los protocolos y composiciones descritos en la presente memoria se ensayan preferiblemente *in vitro*, y después *in vivo*, para la actividad terapéutica, o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes terapéuticos y métodos pueden cribarse usando células de una línea celular tumoral o maligna. Pueden usarse  
50 muchos ensayos estándar en la técnica para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, por recuento celular directo, detectando cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse por tinción con azul de tripán, la diferenciación puede evaluarse visualmente sobre la base de cambios en la morfología, crecimiento disminuido y/o  
55 formación de colonias en agar blando o formación de redes tubulares en membrana de basamento tridimensional o preparación de matriz extracelular, etc.

Los compuestos para uso en terapia pueden ensayarse en sistemas de modelos animales adecuados antes del ensayo en seres humanos, incluyendo pero no limitado a en ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. Los compuestos pueden usarse entonces en los estudios clínicos apropiados.

- 5 Además, cualesquiera ensayos conocidos para los expertos en la técnica pueden usarse para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación descritas en la presente memoria para el tratamiento o prevención de cáncer, trastorno inflamatorio, o enfermedad autoinmune.

### 5.7 Métodos de diagnóstico

- 10 Los anticuerpos de la invención marcados pueden usarse para propósitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar, o monitorizar enfermedades, trastornos o infecciones. También se discute la detección o diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección, particularmente una enfermedad autoinmune que comprende: (a) ensayar la expresión de FcγRIIB en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a FcγRIIB; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel control, por ejemplo, los niveles en muestras de tejido normal, mediante lo cual un incremento en el nivel ensayado de antígeno comparado con el nivel control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección.

- 15 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para ensayar los niveles de FcγRIIB en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos como se describe en la presente memoria o como es conocido para los expertos en la técnica (por ejemplo, véase, Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpo útiles para detectar la expresión génicas de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores de ensayos de anticuerpo adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (<sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>H), indio (<sup>121</sup>In), y tecnecio (<sup>99m</sup>Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

- 25 También se describe la detección y diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección en un ser humano. El diagnóstico puede comprender: a) administrar (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente, o intraperitonealmente) a un sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo marcado que se une inmunoespecíficamente a FcγRIIB; b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios en el sujeto donde se expresa FcγRIIB (y que la molécula marcada no unida se aclare hasta un nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de manera que la detección del anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno, o infección. El anticuerpo se marca con un resto formador de imágenes que es detectable usando un sistema formador de imágenes conocido para un experto en la técnica. El nivel de fondo puede determinarse por varios métodos incluyendo comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema particular.

- 35 Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema formador de imágenes usado determinarán la cantidad de resto formador de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada variará normalmente de aproximadamente 5 a 20 millicuries de <sup>99m</sup>Tc. El anticuerpo marcado se acumulará preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. La formación de imágenes de tumor *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

- 45 Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo posterior a la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en los sitios del sujeto y que la molécula marcada no unida se aclare hasta un nivel de fondo es 6 a 48 horas ó 6 a 24 horas ó 6 a 12 horas. En otro ejemplo, el intervalo de tiempo posterior a la administración es 5 a 20 días ó 5 a 10 días.

- 50 La monitorización de una enfermedad, trastorno o infección puede llevarse a cabo repitiendo el método para diagnosticar la enfermedad, trastorno o infección, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

- 55 La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para el escaneo *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la especificación incluyen, pero no están limitados a, tomografía computerizada (CT), escaneo de cuerpo completo tal como tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), y sonografía.

En un ejemplo específico, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un

instrumento quirúrgico respondedor a la radiación (Thurston et al., Patente U.S. No. 5.441.050). En otro ejemplo, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de escaneo respondedor a la fluorescencia. En otro ejemplo, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otro ejemplo más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

## 6. Ejemplos

### 6.1 Preparación de anticuerpos monoclonales

Se produjo un anticuerpo monoclonal de ratón a partir del clon 8B5.3.4 con número de acceso ATCC PTA-7610. Se generó un anticuerpo monoclonal de ratón que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo monoclonal se une a FcγRIIA. Los ratones transgénicos para FcγRIIA (generados en el Laboratorio del Dr. Ravetch, Rockefeller University) se inmunizaron con FcγRIIB purificado del sobrenadante de células 293 que se habían transfectado con ADNc que codifica el dominio extracelular del receptor FcγRIIB humano, residuos 1-180. Se produjeron líneas celulares de hibridoma a partir de las células del bazo de estos ratones y se cribaron para anticuerpos que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que los anticuerpos se unen a FcγRIIA.

### 6.2 Cribado y caracterización de los anticuerpos

#### 6.2.1 Materiales y métodos

Los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma se criban para inmunoreactividad frente a FcγRIIA o FcγRIIB usando ensayos ELISA. En cada caso, la placa se recubre con 100 ng/pocillo de FcγRIIA o FcγRIIB. La unión del anticuerpo al receptor específico se detecta con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con HRP mediante la monitorización de la absorbancia a 650 nm.

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

En un ensayo de liberación de β-hexoaminidasa se monitoriza la capacidad de un anticuerpo del sobrenadante de hibridoma para inhibir la liberación inducida por Fcγ de β-hexoaminidasa. Se transfectan células RBL-2H3 con FcγRIIB humano; las células se estimulan con varias concentraciones de fragmento F(ab)<sub>2</sub> anti-ratón de cabra que varían de 0,03 μg/mL a 30 μg/mL; se sensibilizan bien con IgE de ratón sola (a 0,01 μg/mL) o con un anticuerpo anti-FcγRIIB. Después de 1 hora de incubación a una temperatura de 37°, las células se sedimentan; el sobrenadante se recoge; y las células se lisan. La actividad β-hexoaminidasa liberada en el sobrenadante se determina en un ensayo colorimétrico, usando p-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida. La actividad de liberación de β-hexoaminidasa se expresa como un porcentaje de la actividad liberada respecto a la actividad total.

**Análisis BIAcore:** La unión de los anticuerpos a CD32A-H<sup>131</sup>, CD32A-R<sup>131</sup> o CD32B se analizó por resonancia de plasmón superficial en un biosensor BIAcore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) usando dominios extracelulares solubles de los receptores expresados en células 293H. El anticuerpo de captura, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo específico de anti-Fc de ratón de cabra (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA), se inmovilizó en el chip sensor CM-5 según el procedimiento recomendado por el fabricante. Brevemente, los grupos carboxilo en la superficie del chip sensor se activaron con una inyección de una disolución que contiene 0,2M N-etil-N-(3dietilamino-propil) carbodiimida y 0,05M N-hidroxi-succinimida. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> se inyectó sobre la superficie activada de CM-5 en 10mM acetato de sodio, pH 5,0, a una velocidad de flujo de 5 μl/min durante 420 seg, seguido de 1 M etanolamina para desactivación. Los experimentos de unión se realizaron en tampón HBS-P que contenía 10mM Hepes, pH 7,4, 150mM NaCl, y 0,005% tensioactivo P20. Cada anticuerpo monoclonal se capturó en el chip CM-5 inyectando una disolución de anticuerpo 300nM a una velocidad de flujo de 5 μl/min durante 240seg, seguido de una inyección de los receptores monoméricos solubles a una concentración de 100 nM y una velocidad de flujo de 50 μl/min durante 120seg con un tiempo de disociación de 180seg. La regeneración de la superficie GAM F(ab')<sub>2</sub> se realizó por inyección de pulso de 50mM glicina, pH 1,5 y 50mM NaOH. Las curvas de referencia se obtuvieron por inyección de cada receptor soluble sobre la superficie de GAM F(ab')<sub>2</sub> inmovilizado sin anticuerpo capturado. Las curvas de referencia se restaron y las respuestas se normalizaron al mismo nivel de anticuerpo capturado. Para obtener parámetros cinéticos de unión de receptores solubles a anticuerpos capturados, se restaron las curvas de unión a IgG correspondiente a concentraciones correspondientes. Las curvas resultantes se analizaron por ajuste ka/kd separado. Los valores de K<sub>D</sub> se calcularon como el promedio de cuatro curvas a dos concentraciones diferentes.

**ANÁLISIS FACS:** se tiñen células CHO, que expresan FcγRIIB con varios anticuerpos y se analizan por FACS. En una serie de experimentos, las células se marcan directamente para determinar si los anticuerpos monoclonales reconocen el receptor.

5 En el experimento FACS de bloqueo, se monitoriza la capacidad del anticuerpo del sobrenadante de hibridoma para bloquear la unión de IgG agregada a FcγRIIB. Aproximadamente 1 millón de células (células CHO que expresan FcγRIIB) para cada muestra se incuban en hielo durante 30 minutos con 2 μg del control de isotipo (IgG1 de ratón) o con el anticuerpo 8B5.3.4. Las células se lavan una vez con PBS+1%BSA y se incuban con 1 μg de IgG humana biotilada agregada durante 30 minutos en hielo. Las células se lavan y se añaden los anticuerpos secundarios, anti-ratón de cabra-FITC para detectar el anticuerpo unido y estreptavidina conjugada con PE para detectar la IgG humana biotilada agregada unida y se incuban en hielo durante 30 minutos. Las células se lavan y se analizan por FACS.

10 Los linfocitos B se tiñen para detectar la presencia de FcγRIIB y CD20. Se incuban 200 μl de "capa leucoplaquetaria" para cada muestra en hielo con 2 μg de control de isotipo o los anticuerpos monoclonales, 8B5.3.4. Las células se lavan una vez con PBS+1%BSA y se incuban con 1 μl de anticuerpo anti ratón de cabra-PE durante 30 minutos en hielo. Las células se lavan una vez y se añade el anticuerpo CD20-FITC (2 μg) a las muestras y se incuban en hielo durante 30 minutos. Todas las muestras se lavan con PBS+1%BSA una vez y las células se analizan por FACS.

15 Los PBMC humanos se tiñen con los anticuerpos 8B5.3.4 e IV.3, seguido de un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con cianina (Cy5) (tinción de dos colores usando anti-CD20 conjugado con FITC para los linfocitos B, anti-CD14 conjugado con PE para los monocitos, anti-CD56 conjugado con PE para las células NK y anti-CD16 conjugado con PE para los granulocitos.

20 **ENSAYO ADCC:** Se marcan  $4-5 \times 10^6$  células diana que expresan el antígeno Her2/neu (células IGROV-1 o SKBR-3) con bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-t-6"-dicarboxilato (Reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). El reactivo BATDA se añade a las células y la mezcla se incuban a 37°C preferiblemente bajo 5% CO<sub>2</sub>, durante al menos 30 minutos. Las células se lavan con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con 0,125 mM sulfinpirazol, y medio que contiene 0,125 mM sulfinpirazol. Las células diana marcadas se añaden a células efectoras, por ejemplo, PBMC, para producir relaciones de efector a diana de aproximadamente 50:1, 75:1, ó 100:1. Las PBMC se aíslan poniendo en capas sangre completa en Ficoll-Hypaque (Sigma) y sedimentando a temperatura ambiente durante 30 mins a 500 g. La capa leucocitaria se recoge como efectores para ensayos ADCC basados en europio. Se usan monocitos congelados o recién aislados elutriados (Advanced Biotechnologies, MD) como efectores con las líneas celulares tumorales diana a una relación efector a diana variada de 100:1 a 10:1 y la concentración de los anticuerpos se titula de 1-15 μg/ml. Los monocitos obtenidos como preparaciones madre congeladas estimulados con citoquinas se usan como células efectoras en ensayos ADCC. Si los monocitos congelados tienen un rendimiento óptimo se usarán rutinariamente, en otro caso se usarán células frescas. MDM se preparará por tratamiento con citoquinas GM-CSF o M-CSF que se sabe que aumentan la viabilidad y diferenciación de monocitos en cultivo. MDM se estimularán con citoquinas y la expresión de los distintos FcγR (I, IIA, IIB, y IIIA) se determinará por análisis FACS.

25 Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, y hasta 16 horas, a 37°C, bajo 5% CO<sub>2</sub> en presencia de un anticuerpo anti-tumoral, específico para un antígeno expresado en las células diana, Her2/neu, y en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-FcγRIIB. Un anticuerpo 4D5 quimérico que se ha preparado por ingeniería para contener la mutación N297A se usa como un control negativo ya que este anticuerpo se une a las células tumorales diana a través de su región variable. La pérdida de glicosilación en este sitio suprime la unión de la región Fc del anticuerpo a FcγR. La IgG1/k humana disponible comercialmente sirve como un control de isotipo para el anticuerpo anti-FcγRIIB. Los sobrenadantes celulares se recogen y se añaden a una disolución ácida de europio (por ejemplo, disolución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos europio-TDA formados se cuantifica en un fluorímetro de tiempo resuelto (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan por incubación de las células diana con 1% TX-100 y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpo (AICC) se mide por incubación de las células diana y efectoras en ausencia de anticuerpo. Cada ensayo se realiza preferiblemente en triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como: Liberación experimental (ADCC) - AICC)/(MR-SR) x 100.

## 6.2.2 Caracterización del anticuerpo monoclonal producido a partir del clon 8b5.3.4

30 **Unión directa del anticuerpo producido a partir del clon 8B5.3.4 a FcγRIIA y FcγRIIB:** La unión directa del MAb 8B5.3.4 producido a partir del clon 8B5.3.4 a FcγRIIA y FcγRIIB se comparó por ensayo ELISA con placas recubiertas con FcγRIIA y FcγRIIB (Tabla 8 y FIG. 1). El sobrenadante del cultivo del clon de hibridoma 8B5.3.4 que contenía el MAb 8B5.3.4 se ensayó (en duplicado) para unión específica a FcγRIIA y FcγRIIB. El sobrenadante del clon de hibridoma 8B5.3.4 tiene una afinidad significativamente mayor para FcγRIIB que para FcγRIIA, como se indica por los valores de absorbancia más altos respecto a los controles positivo y negativo en la Tabla 8 (FIG. 1).



**Tabla 8: Resultados de ensayo ELISA para caracterizar la unión de MAb 8B5.3.4 producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 a FcγRIIA y FcγRIIB. Se reportan los valores de absorbancia (en duplicado) a 650 nm para cada muestra.**

	Pocillos recubiertos con CD32A	Pocillos recubiertos con CD32B
<b>8B5.3.4</b>	0,094	2,044
	0,092	2,028
<b>Control negativo</b>	0,071	0,074
	0,065	0,078
<b>Control positivo</b>	0,340	0,332
	0,352	0,308

5 **Isotipado de MAb 8B5.3.4 producido a partir del clon 8B5.3.4:** El isotipo del MAb 8B5.3.4 se determinó por ensayo ELISA (Tabla 9 y FIG. 2). Se ensayaron anticuerpos frente a varios isotipos indicados. Los valores de absorbancia en la Fig. 2 muestran que los anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, y anti-kappa tienen la mayor reactividad con el MAb 8B5.3.4, lo que indica que el MAb 8B5.3.4 tiene un isotipo IgG1/kappa.

10 **Tabla 9: Resultados de ensayo ELISA para caracterizar el isotipo de MAb 8B5.3.4 producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4. Se reportan los valores de absorbancia a 650 nm para el isotipo de anticuerpo indicado.**

Isotipo del anticuerpo	Absorbancia a 650 nm
IgG	2,828
IgG3	0,165
IgM	0,105
IgG2a	0,246
IgG2b	0,213
IgG1	2,488
IgA	0,363
kappa	0,511

### 6.2.3 Ensayos ADCC *in vivo*

#### 6.2.3.1 Actividad de los anticuerpos FcγRIIB en modelos murinos de xenoinjerto usando líneas celulares tumorales humanas

15 Se utilizan ratones desnudos Balb/c hembra de seis a ocho semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME; Taconic) para establecer los modelos de xenoinjerto de carcinoma de ovario y mama. Los ratones se estabulan en instalaciones de bioseguridad nivel 2 para el modelo de xenoinjerto que usa las células de ovario derivadas de ascitis y células de cáncer de mama derivadas de efusión pleural como fuentes de tumores. Los ratones se ponen en grupos de 4 para estos experimentos y se monitorizan tres veces a la semana. El peso de los ratones y el tiempo de supervivencia se registran y los criterios para el crecimiento de tumores es distensión abdominal y tumores palpables.

20 Los ratones que muestran signos de malestar visible o que alcanzan 5 gramos de peso tumoral se sacrifican por eutanasia con dióxido de carbono y se someten a autopsia. Los animales tratados con anticuerpo se

ponen bajo observación durante dos meses adicionales después del grupo control.

**Establecimiento del modelo de xenoinjerto tumoral con líneas celulares tumorales.** Con el fin de establecer el modelo de xenoinjerto tumoral, se inyectan  $5 \times 10^6$  células IGROV-1 o SKBR-3 viables s.c en tres ratones desnudos hembra con concordancia de edad y peso con Matrigel (Becton Dickinson). El peso estimado del tumor se calcula por la fórmula: longitud x (anchura)<sup>2</sup>/2 que no debe superar los 3 gramos. Para el paso *in vivo* de las células para expansión, se aísla tumor dependiente de anclaje y las células se disocian añadiendo 1 µg de colagenasa (Sigma) por gramo de tumor a 37 C toda la noche.

La inyección de células IGROV-1 subcutáneamente da lugar a tumores con crecimiento rápido mientras la ruta intraperitoneal induce una carcinomatosis peritoneal que mata a los ratones en 2 meses. Como las células IGROV-1 forman tumores en 5 semanas, en el día 1 después de la inyección de células tumorales, se co-inyectan i.p. monocitos como efectores junto con los anticuerpos terapéuticos ch4D5 y ch8B5.3.4 a 4 µg cada uno por gm de peso corporal de ratón (mbw) (Tabla 10). La inyección inicial es seguida de inyecciones semanales de anticuerpos durante 4-6 semanas posteriormente. Las células efectoras humanas se reponen una vez cada dos semanas. Un grupo de ratones no recibirá anticuerpo terapéutico sino que se le inyectará ch4D5 N297A e IgG1 humana como anticuerpos de control de isotipo para el anticuerpo anti-tumoral y ch8B5.3.4, respectivamente.

**Tabla 10: Resumen de los estudios de aclaramiento tumoral con anticuerpo anti-Her2neu quimérico ch4D5 y anticuerpo anti-FcyRIIB quimérico ch8B5.3.4 (o anticuerpo anti-FcyRIIB humanizado (h8B5.3.4)) en modelo de xenoinjerto tumoral en ratones desnudos con monocitos humanos transferidos de forma adoptiva como efectores ADCC. MBW (peso corporal del ratón).**

8 ratones/grupo	Célula tumoral s.c día 0	Monocitos i.p en el día 1	ch4D5 a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch4D5 N297A a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	ch8B5.3.4 N297A a 4 µg/gm de mbw día 1 i.p	IgG1 humana 4 µg/gm de mbw día 1 i.p
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-
E	+	+	-	-	+	-
F	+	+	-	+	-	+

Como se muestra en la Tabla 10, se requieren 6 grupos de 8 ratones cada uno para ensayar el papel de un anticuerpo anti-FcyRIIB en el aclaramiento tumoral con una combinación diana y efector, con dos combinaciones diferentes de concentraciones de anticuerpo. Estos grupos son A) células tumorales, B) células tumorales y monocitos, C) células tumorales, monocitos, anticuerpo anti-tumoral, ch4D5, D) células tumorales, monocitos, anticuerpo anti-tumoral ch4D5, y un anticuerpo anti-FcyRIIB, por ejemplo, ch8B5.3.4, E) células tumorales, monocitos, y un anticuerpo anti-FcyRIIB, por ejemplo, ch8B5.3.4, y F) células tumorales, monocitos, ch4D5 N297A, e IgG1 humana. Pueden ensayarse varias combinaciones de concentración de anticuerpo en esquemas similares.

Los estudios usando la línea celular de cáncer de mama, SKBR-3, se llevan a cabo en paralelo con el modelo IGROV-1 ya que las células SKBR-3 sobreexpresan Her2/neu. Esto incrementará la astringencia de la evaluación del papel del anticuerpo anti-FcyRIIB en el aclaramiento tumoral. Sobre la base del resultado de los estudios de aclaramiento tumoral con las células IGROV-1, se hacen modificaciones en el diseño experimental de futuros experimentos con otras dianas.

El punto final del modelo de xenoinjerto tumoral se determina sobre la base del tamaño de los tumores (peso de los ratones), tiempo de supervivencia, y reporte de histología para cada grupo en la Tabla 10. Los ratones se monitorizan tres veces a la semana; los criterios para el crecimiento de tumores son distensión abdominal y presencia de masas palpables en la cavidad peritoneal. Se calculan las estimaciones del peso tumoral frente a los días después de la inoculación. Sobre la base de estos criterios los ratones del grupo D en la Tabla 10 frente a los demás grupos de ratones definirá el papel de los anticuerpos anti-FcyRIIB en el aumento del aclaramiento tumoral. Los ratones que muestran signos de dolor visible o que alcanzan 5 gramos de peso tumoral se sacrifican por eutanasia con dióxido de carbono y se someten a autopsia. Los animales tratados con anticuerpo se siguen durante dos meses después de este punto de tiempo.

### 6.2.3.2 Actividad *in vivo* de anticuerpos FCγRIIB en modelo murino de xenoinjerto con células derivadas de carcinoma primario de ovario y mama humano

Los tumores primarios se establecen a partir de cánceres primarios de ovario y mama mediante la transferencia de células tumorales aisladas de exudados de pacientes con carcinomatosis. Con el fin de trasladar estos estudios a la clínica, el modelo de xenoinjerto se evalúa con células tumorales derivadas de ascitis y efusión pleural de dos pacientes con carcinoma de ovario y dos con carcinoma de mama, respectivamente. La efusión pleural, como una fuente de células de cáncer de mama, y el implante de tejido de mama maligno se han usado para establecer modelos murinos de xenoinjerto con éxito, véase, por ejemplo, Sakakibara et al., 1996, Cancer J. Sci. Am. 2: 291. Estos estudios determinarán la aplicación de amplio rango del anticuerpo anti-FcγRIIB en el aclaramiento tumoral de células primarias. El aclaramiento tumoral se ensaya usando anticuerpo anti-tumoral, ch4D5 y anticuerpo anti-FcγRIIB, por ejemplo, ch8B5.3.4, en el modelo de ratones desnudos Balb/c con monocitos humanos transferidos de forma adoptiva

**Células tumorales primarias humanas derivadas de ascitis y efusión pleural.** Se usan ascitis de pacientes con cáncer de ovario y efusiones pleurales de pacientes con cáncer de mama. Las ascitis y efusiones pleurales de pacientes pueden contener 40-50% de células tumorales y las muestras con una alta expresión de células tumorales Her2neu+ se usarán para establecer los modelos de xenoinjerto.

Las muestras de ascitis y efusión pleural se ensayan para expresión de Her2/neu en células neoplásicas antes del establecimiento del modelo de xenoinjerto tumoral. Se determinará el porcentaje de células neoplásicas frente a otros subconjuntos celulares que puede influir en el establecimiento del modelo tumoral. Las ascitis y efusión pleural de pacientes con cáncer de ovario y mama, respectivamente, se analizan rutinariamente para determinar el nivel de expresión de Her2/neu+ en las células neoplásicas. Se usa análisis FACS para determinar el porcentaje de células neoplásicas Her2/neu+ en las muestras clínicas. Las muestras con un alto porcentaje de células neoplásicas Her2/neu+ se seleccionan para el inicio de tumores en ratones Balb/c.

**Histoquímica e inmunohistoquímica.** La histoquímica e inmunohistoquímica se realiza en ascitis y efusión pleural de pacientes con carcinoma de ovario para analizar las características estructurales de la neoplasia. Los marcadores que se monitorizan son citoqueratina (para identificar células neoplásicas y mesoteliales de ovario de células inflamatorias y mesenquimales); calretinina (para separar células mesoteliales de neoplásicas positivas para Her2/neu); y CD45 (para separar células inflamatorias del resto de la población celular en las muestras). Los marcadores adicionales que se seguirán incluirán CD3 (células T), CD20 (células B), CD56 (células NK), y CD14 (monocitos).

Para la tinción por inmunohistoquímica, se preparan secciones congeladas y tejidos parafinizados por técnicas estándar. Las secciones congeladas así como las desparafinizadas se tiñen en un protocolo de tinción similar. La peroxidasa endógena de los tejidos se inactiva sumergiendo los portaobjetos en 3% peróxido de hidrógeno y lavando con PBS durante 5 minutos. Las secciones se bloquean y se añade el anticuerpo primario ch4D5 en suero de bloqueo durante 30 minutos seguido de lavado de las muestras con PBS tres veces. El anticuerpo anti-humano secundario conjugado con biotina se añade durante 30 minutos y los portaobjetos se lavan en PBS durante 5 minutos. El complejo avidina-Biotina peroxidasa (Vector Labs) se añade durante 30 minutos seguido de lavado. El color se desarrolla incubando los portaobjetos en disolución fresca de sustrato DAB y la reacción se para lavando con agua del grifo. Para la tinción H y E, los portaobjetos se desparafinan y se hidratan en diferentes concentraciones de alcohol. Los portaobjetos se lavan con agua del grifo y se ponen en hematoxilina durante 5 minutos. El exceso de tinción se elimina con ácido-alcohol, seguido de amoníaco, y agua. Los portaobjetos se ponen en eosina y se sigue de lavados con 90 a 100% alcohol para deshidratación. Finalmente, los portaobjetos se ponen en xileno y se montan con fijador para almacenamiento a largo plazo. En todos los casos, el porcentaje de células tumorales se determina por tinción de Papanicolaou.

**Tinción histoquímica.** Los ascitis de dos pacientes diferentes con carcinoma de ovario se tiñen con hematoxilina y eosina (H y E) y Giemsa para analizar la presencia de células tumorales y otros tipos celulares.

**Modelos murinos.** Las muestras de pacientes con carcinoma de ovario se procesan sedimentando los ascitis a 6.370g durante 20 minutos a 4C, lisando las células sanguíneas rojas seguido de lavado de las células con PBS. Sobre la base del porcentaje de células tumorales Her2/neu+ en cada muestra, se seleccionan dos muestras, con expresión media y alta, para inoculación s.c para establecer el modelo de xenoinjerto para evaluar el papel del anticuerpo anti-FcγRIIB en el aclaramiento de los tumores. Se ha reportado que las células tumorales representan hasta el 40-50% del subconjunto de células de ascitis no procesados, y después de la purificación se obtuvieron ~ 10-50 x 10<sup>6</sup> células tumorales de 2 litros de ascitis (Barker et al., 2001, Gynecol. Oncol. 82: 57-63). Las células de ascitis aisladas se inyectan i.p. en ratones para expandir las células. Se inyectarán a aproximadamente 10 ratones i.p. y los ascitis de cada ratón se pasan además a dos ratones cada uno para obtener ascitis de un total de 20 ratones que se usan para inyectar a un grupo de 80 ratones. La efusión pleural se gestiona de manera similar a los ascitis y se inyectan células tumorales Her2neu+ en las almohadillas mamarias superior derecha e izquierda en matrigel. Después de la inoculación s.c. de las células tumorales, los ratones se siguen para cambios clínicos y anatómicos. Según se necesite, los ratones pueden someterse a necropsia para correlacionar la carga tumoral total con localización de órgano específica.

### 6.3 Cribado de anticuerpos monoclonales específicos de CD32B

Los anticuerpos específicos de CD32B se cribarán para reactividad, asociación a balsas, CDC, e inducción de apoptosis en líneas de linfoma de células B de pacientes con malignidades de células B. El aislamiento de las células de pacientes y el cribado de reactividad se ha descrito anteriormente.

5 **Asociación raft.** Como una medida de la capacidad del anticuerpo de desencadenar la redistribución del antígeno en microdominios de membrana especializados, se realiza convenientemente la asociación a balsas lipídicas midiendo la cantidad de anticuerpo recuperada en la fracción celular insoluble en detergente después de la lisis con 0,5% TX-100 a 4C (Veri et al., 2001, Mol Cell Bio 21:6939-6950; Cragg et al., 2004, Blood 103:2738-43). En un experimento típico, las células se recubrirán en hielo con el anticuerpo de interés y se lavarán. Una alícuota se someterá a entrecruzamiento adicional con un anticuerpo secundario apropiado. Las células sedimentadas se someterán a fraccionamiento con detergente TX-100. Se solubilizarán muestras paralelas con glucopiranosido, un detergente que se sabe que destruye las balsas lipídicas, o directamente con tampón de muestra Laemmli basado en SDS para obtener la cantidad total de anticuerpo asociado a las células. Las fracciones insolubles se analizarán por SDS-PAGE y transferencia western. La redistribución a balsas lipídicas con o sin entrecruzamiento adicional se registrará por comparaciones densitométricas.

10 **CDC.** CDC se evaluará por uno de varios métodos conocidos en la técnica, tal como exclusión de yoduro de propidio (PI) en análisis FACS (Cragg et al., 2004, Blood 103:2738-43) o liberación de radiomarcador tradicional (por ejemplo, liberación de <sup>51</sup>Cr y <sup>111</sup>In). Brevemente, las células se incubarán con cantidades tituladas de los anticuerpos de interés durante 15 min a 37C seguido de la adición de suero (20% concentración final) como una fuente de complemento y la incubación se continúa durante 5 min adicionales antes del análisis. Debido a la alta variación del suero humano, se usará suero de conejo Pel-Freeze como una fuente estándar de complemento. También se preparará suero humano normal combinado AB. Cada lote de suero se ensayará en lisis de células sanguíneas rojas frente a suero de conejo como medida de calidad.

20 **Apoptosis.** La apoptosis inducida por anticuerpos anti-CD32B solubles o inmovilizados en placas se estudiará por metodología estándar basada en FACS usando la translocación en la membrana de anexina V y tinción con PI (Cragg et al., 2004, Blood 103:2738-43) en análisis multicolor para identificar la población de interés (por ejemplo, Cy5-CD19). Brevemente, las células se tratarán durante diferentes intervalos de tiempo (2 a 18 horas) con cantidades tituladas del anticuerpo de interés en disolución libre o inmovilizado en placas de 96 pocillos. Las células se recuperarán por raspado suave y/o centrifugación y se teñirán con 1 ug/ml de FITC-anexina V más 10 ug/ml de PI para distinguir entre apoptosis temprana y necrosis secundaria.

### 6.4 Estudios de aclaramiento tumoral *in vivo* en modelos murinos de xenoinjerto tumoral de linfomas

La capacidad para prevenir tumores en un modelo de ratón de linfoma es un criterio importante para determinar el potencial de un anticuerpo para continuar en estudios clínicos.

35 Están disponibles varias líneas celulares de linfoma de Burkitt bien caracterizadas para uso como modelos de NHL (Epstein et al., 1966, J Natl Cancer Inst 37:547-559; Klein et al., 1968, Cancer Res 28:1300-1310; Klein et al., 1975, Intervirology 5:319-334; Nilsson et al., 1977, Intl J Cancer 19:337-344; Ohsugi et al., 1980, J Natl Cancer Inst 65:715-718). A xenograft model of lymphoma formation has been established in nude mice similar to previously reported models (Vallera et al., 2003, Cancer Biother Radiopharm 18:133-145; Vuist et al., 1989, Cancer Res 49:3783-3788).

40 Brevemente, la línea celular de linfoma de Burkitt, Daudi (5-10x10<sup>6</sup> células), se trasplantará subcutáneamente en una cepa de ratón nu/nu inmunodeficiente. La cepa de ratón BALB/c nu/nu se usará junto con PBMC humanos transferidos de forma adoptiva purificados de un donante sano como células efectoras. Una población de células efectoras dominante en PBMC humano está representada por células NK, que ejercen ADCC a través de su CD16A (FcyRIIIa). También se usará una cepa de ratón nu/nu en la que el gen CD16A murino se ha inactivado y que se ha preparado por ingeniería genética para expresar CD16A humano. Este ratón nu/nu CD16A<sup>-</sup>/huCD16A<sup>+</sup> permite el examen de actividad anti-tumoral en el contexto de un receptor Fc humano sin la necesidad de la transferencia adoptiva de células humanas.

45 Los ratones se tratarán con el anticuerpo quimerizado seleccionado inyectado i.p. en el día 1, 4, 7, y 15. Se usará una dosis de partida de 4 ug/g de peso corporal, pero se ensayarán dosis adicionales para establecer la potencia relativa de los anticuerpos en este modelo. Se usarán Rituxan y Campath para comparación. Además, también se estudiará el sinergismo potencial de la terapia de combinación con Rituxan o Campath. En estos estudios, se monitorizarán el crecimiento tumoral y la morbilidad para comparar los grupos tratado con anticuerpo y control. Los ratones se sacrificarán inmediatamente si están moribundos o al finalizar los estudios. Los tumores se escindirán y se realizará una necropsia macroscópica y microscópica. La citopatología en secciones incluidas en parafina y la inmunohistoquímica en secciones congeladas se realizarán para una evaluación morfológica e inmunológica del tumor y los infiltrados celulares.

**Listado de secuencias**

- <110> MacroGenics, Inc.
- 5 <120> Anticuerpos específicos de FCgammaRIIB y método de uso de éstos
- <130> 13783-105016
- <140> PCT/US2007/072153
- 10 <141> 26-06-2007
- <150> US 60/816.688
- <151> 26-06-2006
- 15 <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- 20 <211> 321
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Sintética
- <220>
- <221> característica\_misc
- <223> secuencia de nucleótidos de 8B5.3.4 VL
- 30 <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgccg cgctgggaga aagagtcagt  | 60  |
| ctcacttgtc gggcaagtca ggaattagtg ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca  | 120 |
| gatggaacta ttaaaccgct gatctacgcc gcattccact tagattctgg tgtcccaaaa  | 180 |
| aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct  | 240 |
| gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgt | 300 |
| gggaccaagc tggagctgaa a  | 321 |
- 35 <210> 2
- <211> 348
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Sintética
- <220>
- <221> característica\_misc
- 45 <223> secuencia de nucleótidos de 8B5.3.4 VH
- <400> 2
- |   |     |
|---|-----|
| gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc | 60  |
| tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctggg tggactgggt ccgtcagtct | 120 |
| ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaca aagctaaaaa tcatgcaaca  | 180 |
| tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt | 240 |
| gtctacctgc aaatgaacag ctaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct  | 300 |
| ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcg              | 348 |
- 50 <210> 3

ES 2 599 319 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VL

<400> 3

```

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

15 <210> 4  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

25 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VH

<400> 4

```

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
30 1          5          10          15
  
```

ES 2 599 319 T3

Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala  
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VL (CDR1)

15 <400> 5  
 Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser  
 1 5 10

20 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintética

30 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VL (CDR2)

<400> 6

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser  
 1 5

35 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sintética

45 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VL (CDR3)

<400> 7

Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

5 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VH (CDR1)

20 <400> 8

Asp Ala Trp Met Asp  
 1 5

25 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VH (CDR2)

35 <400> 9

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Gly

40 <210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <223> secuencia de aminoácidos de 8B5.3.4 VH (CDR3)

50 <400> 10

Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr  
 1 5

55 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>



<223> Sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <223> Proteína de fusión - secuencia parcial

<400> 11

Ala Pro Ser Ser Ser  
1 5

10

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Sintética

<220>

20

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<223> Proteína de fusión - secuencia parcial

<400> 12

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser  
1 5

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno de éste, en el que dicho anticuerpo aislado o dicho fragmento de unión a antígeno se une específicamente al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo con mayor afinidad de la que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une a FcγRIIA humano nativo, y en el que:
- 5 i) dicho anticuerpo es anticuerpo 8B5.3.4 producido por una línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610; o
- 10 ii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; o
- 15 iii) dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende las seis CDR del anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, teniendo dichas seis CDR la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5-10, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo de FcγRIIB que el reconocido por el anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610 y compite con dicho anticuerpo 8B5.3.4 para la unión a FcγRIIB humano nativo, y en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno tiene una constante de disociación  $K_d$  ( $K_{disoc}/K_{asoc}$ ) de menos de  $5 \times 10^{-9}$  M según se determina por resonancia de plasmón superficial.
- 20 2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno comprende las seis CDR del anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610, teniendo dichas seis CDR las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 5-10, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo de FcγRIIB que el reconocido por el anticuerpo producido por el clon de hibridoma 8B5.3.4 que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610 y compite con dicho anticuerpo 8B5.3.4 para la unión a FcγRIIB humano nativo, y en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno tiene una constante de disociación  $K_d$  ( $K_{disoc}/K_{asoc}$ ) de menos de  $5 \times 10^{-9}$  M según se determina por resonancia de plasmón superficial.
- 25 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo 8B5.3.4 producido por la línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-7610.
- 30 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo biespecífico, o es una forma humanizada de dicho anticuerpo 8B5.3.4.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 35 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 o reivindicación 2 que tiene un dominio Fc que comprende al menos una modificación en el dominio Fc de la cadena pesada.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 6, en el que el dominio Fc de la cadena pesada del anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 240, 243, 247, 255, 270, 292, 300, 305, 316, 370, 392, 396, 416, 419, ó 421 con otro aminoácido en esa posición.
- 40 8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el dominio Fc de la cadena pesada del anticuerpo tiene una leucina en la posición 243, una prolina en la posición 292, una leucina en la posición 300, una isoleucina en la posición 305, y una leucina en la posición 396.
9. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que es un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento F(ab).
- 45 10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno está unido de forma operativa a un polipéptido heterólogo o está conjugado con un agente terapéutico.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 10, en el que el agente terapéutico es:
- 50 (A) un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un receptor de la superficie celular distinto de FcγRIIB;
- o
- (B) un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno asociado a tumor.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste de la reivindicación 1 que reduce la unión de un Ig-Fc a

FcγRIIB.

13. Una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que comprende además un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un agente terapéutico de radiación, un agente terapéutico hormonal, un agente inmunoterapéutico, un agente anti-inflamatorio, y un agente inmunomodulador.

**Figura 1**

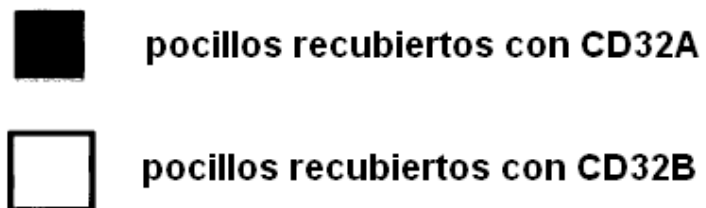
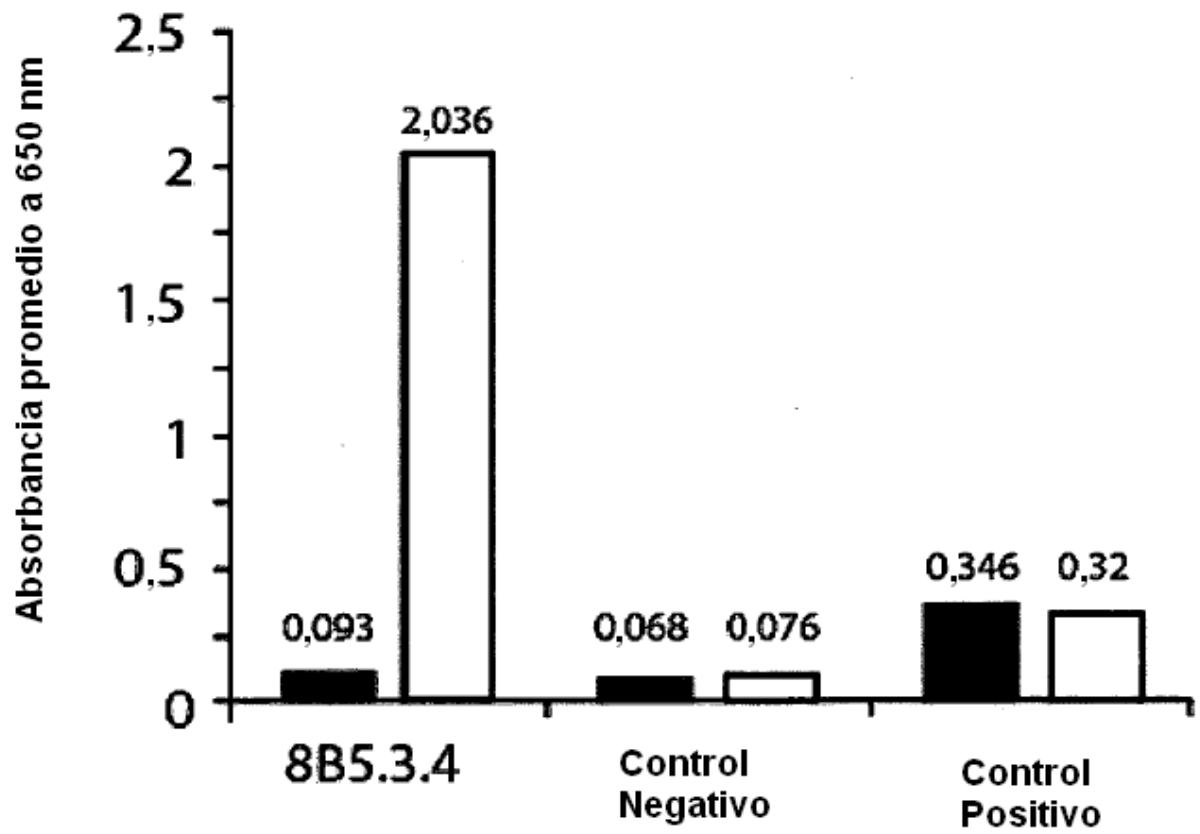


Figura 2

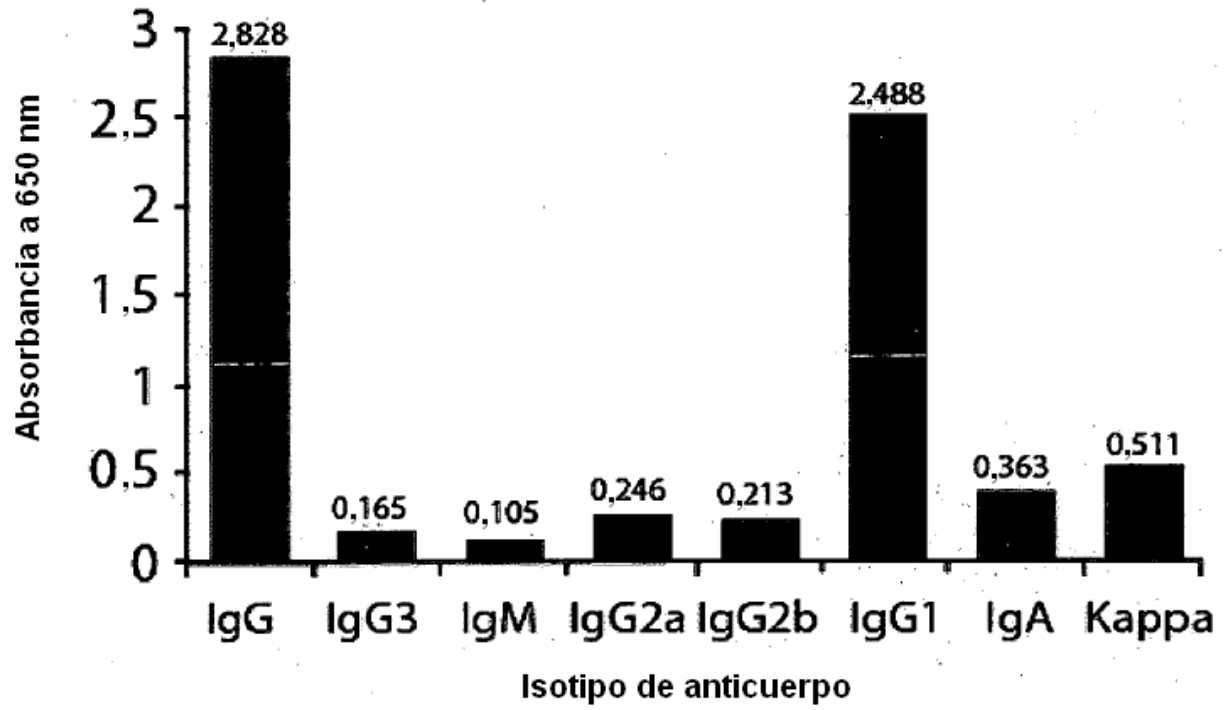


Figura 3

Secuencia de nucleótidos/aminoácidos de 8B5.3.4 VL

gac att cag atg aca cag tct cca tcc tcc cta ctt gcg gcg ctg gga 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gaa att agt ggt tac 96  
 Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr  
 20 25 30

tta agc tgg ctt cag cag aaa cca gat gga act att aaa cgc ctg atc 144  
 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45

tac gcc gca tcc act tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gag tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agt ctt gag tct 240  
 Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser  
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat ttt agt tat ccg ctc 288  
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 321  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

*CDR1*  
*CDR2*  
*CDR3*

Figura 4

Secuencia de nucleótidos/aminoácidos de 8B5.3.4 VH

gaa	gtg	aag	ctt	gag	gag	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	caa	cct	gga	gga	48
Glu	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1			5					10						15		
tcc	atg	aaa	ctc	tct	tgt	gaa	gcc	tct	gga	ttc	act	ttt	agt	gac	gcc	96
Ser	Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ala	
			20					25						30		
—CDR1—																
tgg	atg	gac	tgg	gtc	cgt	cag	tct	cca	gag	aag	ggg	ctt	gag	tgg	ggt	144
Trp	Met	Asp	Trp	Val	arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40						45			
—CDR2—																
gct	gaa	att	aga	aac	aaa	gct	aaa	aat	cat	gca	aca	tac	tat	gct	gag	192
Ala	Glu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Lys	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	
	50					55					60					
tct	gtg	ata	ggg	agg	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tcc	aaa	agt	agt	240
Ser	Val	Ile	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	
65					70					75					80	
gtc	tac	ctg	caa	atg	aac	agc	tta	aga	gct	gaa	gac	act	ggc	att	tat	288
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	
					85				90					95		
—CDR3—																
tac	tgt	ggg	gct	ctg	ggc	ctt	gac	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	ctc	336
Tyr	Cys	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	
		100					105						110			
aca	gtc	tcc	tcg													348
Thr	Val	Ser	Ser													
			115													