

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 685**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2011 PCT/GB2011/051572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12022985**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2011 E 11760819 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2606068**

54 Título: **Uso combinado de Fc gamma RIIB (CD32B) y de anticuerpos específicos de CD19, CD20 o CD40**

30 Prioridad:

20.08.2010 GB 201013989

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

08.02.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON (100.0%)
University Road Highfield
Southampton Hampshire SO17 1BJ, GB**

72 Inventor/es:

**CRAGG, MARK;
GLENNIE, MARTIN;
ROGHANIAN, ALI;
BEERS, STEPHEN;
JOHNSON, PETER;
LIM, SEAN;
FRENDEUS, BJÖRN y
TEIGE, INGRID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 685 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

Uso combinado de Fc gamma RIIb (CD32B) y de anticuerpos específicos de CD19, CD20 o CD40

La invención es tal como se define mediante las reivindicaciones y se refiere a un segundo anticuerpo que impide el enlace entre el dominio Fc de un primer anticuerpo y FcγRIIb sobre una superficie celular. La invención también se refiere a composiciones que incluyen aquellos agentes para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen células diana, tales como células cancerosas que son tratadas con composiciones a base de anticuerpos.

Además, la invención se refiere a procedimientos para predecir la respuesta de células diana a tratamientos a base de anticuerpo, particularmente donde el ligando de anticuerpo es susceptible a internalización mediada por FcγRIIb y, en particular, al uso de niveles de expresión de FcγRIIb y/o internalización terapéutica mediada por anticuerpo a través de FcγRIIb como un marcador de pronóstico para la respuesta de las células diana a tal tratamiento.

Un mecanismo por el cual los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden ejercer sus efectos terapéuticos estimulando la remoción de células cancerosas y otras no deseadas reclutando sistemas efectores naturales tales como células citotóxicas (por ejemplo macrófagos) y enzimas (por ejemplo complemento) que luego apuntan a la célula a la cual se enlaza el mAb.

Por ejemplo, mAb anti-CD20 de tipo I (tal como el actual líder en el mercado rituximab) actúa enlazándose a moléculas CD20 sobre la superficie de células B, a través de los dominios de enlace de antígeno de mAb, y suprimiendo estas células B diana. Ellos hacen esto reclutando y activando células efectoras que interactúan con los dominios Fc del mAb por medio de Fc-gamma-receptores (FcγR) expresado sobre la superficie de estas células receptoras.

El anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD20 rituximab ha mejorado la supervivencia total (OS por overall survival) de pacientes con linfoma folicular (FL) y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (1-4). En el linfoma de células del manto (MCL), solo se ven respuestas modestas (5) mientras que en leucemia linfocítica crónica (CLL), los ensayos con un solo agente inicial rituximab produjeron respuestas menos impresionantes que en otras contrapartes de linfoma de no Hodgkin (NHL) (revisado en (6)). Una fracción de linfomas muestra resistencia primaria a rituximab o eventualmente se vuelven resistentes a la terapia de combinación que contiene rituximab (7). La base molecular detrás de esta resistencia al tratamiento y las sensibilidades observadas de diferentes subtipos de NHL al tratamiento con rituximab actualmente se desconocen, pero pueden incluir niveles de expresión de CD20 (8-10), alta expresión de moléculas de defensa de complemento (CD55 y CD59) (11, 12), desarrollo de resistencia a apoptosis (13) e interacciones sub-óptimas de Fc-gammareceptor (FcγR) como un resultado de expresión de alelos de baja afinidad (14).

Es altamente deseable incrementar la efectividad de tales anticuerpos donde el tratamiento no es óptimo o la resistencia es evidente.

En términos generales se acepta que las interacciones Fc:FcγR son cruciales para la eficacia de mAb anti-CD20 (15-18). De acuerdo con esto, los pacientes con linfoma que tienen el alelo de afinidad más alta 158V en FcγRIIIa responden mejor a rituximab en comparación con aquellos con halo tipo de afinidad baja 158F (14), que lleva a muchos investigadores a concentrarse en el aumento de la interacción de mAb con FcγRIIIa, por ejemplo a través de la defucosilación (19). En contraste, se ha prestado menos atención a los efectos potenciales del FcγRIIb inhibitorio que actúa como un regulador negativo de actividad estimulante recibida por receptores que tienen ITAM, tales como el receptor de célula B para antígeno (BCR) y FcγR activador. En células B, esta interacción sirve para limitar la proliferación de célula B siguiente al enlace de complejos inmunes, mientras que en macrófagos el involucramiento de FcγRIIb da lugar a la inhibición de actividad citotóxica (15).

Entre las malignidades de célula B, FcγRIIb se expresa en CLL/SLL, MCL y FL, y esta última particularmente durante la transformación. En DLBCL, La expresión de FcγRIIb es más débil, lo cual explica porque no fue demostrable una correlación entre su expresión y su respuesta a la quimioterapia con rituximab-CHOP (R-CHOP) (20, 21). Como en el caso con activadores de FcγRs, también han sido encontrados polimorfismos que influyen la actividad de FcγRIIb (22, 23) con el alelo 232I que inhibe el flujo de calcio mediado por BCR de manera más eficiente que el alelo 232T. Sin embargo, Weng y Levy (24) no pudieron establecer una correlación entre estos polimorfismos y la respuesta a la terapia con rituximab en pacientes con FL.

Un número creciente de mAb anti-CD20 se han hecho disponibles para investigación clínica. Estos diversos mAb anti-CD20 pueden clasificarse como tipo I (por ejemplo rituximab, ofatumumab) o tipo II (por ejemplo tositumomab (B1), GA101, 11B8) de acuerdo con su capacidad para redistribuir CD20 en la membrana de plasma y su actividad en diversos ensayos efectoras (25-27).

Nosotros y otros hemos mostrado que los mAb de tipo II son más potentes en suprimir células B dianas en un número de sistemas modelo (18, 19). Por ejemplo, en un modelo transgénico (Tg) de CD20 humano de supresión normal de células B en el cual la mayor capacidad de mAb de tipo II para provocar muerte celular lisosómica no es

evidente (25, 27), demostramos que esta potencia se correlaciona con su resistencia a la internalización (28). Esto es en contraste con mAb de tipo I, tal como rituximab, que se internalizan rápidamente desde la superficie celular conjuntamente con CD20 en un procedimiento que es dependiente de la energía y de la temperatura e incluye redistribución de actina (28). La velocidad de modulación difiere notablemente sobre células de diferentes orígenes (tumor primario versus líneas celulares; CLL versus FL) aunque la base molecular de esto permanezca sin explicación.

La publicación WO 2008/002933 describe Fc gamma RIIb (CD32B) y anticuerpos específicos de CD20 y procedimientos de tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con células B usando una combinación de ambos anticuerpos. Sin embargo, no hay una enseñanza o sugerencia para reconocer y/o tratar un subconjunto de pacientes, más precisamente aquellos cuyas células diana expresan niveles elevados de FcγRIIb, o a cual tipo de anticuerpos son adecuadas para tratamiento combinado con anticuerpos FcγRIIb.

De manera inesperada, mostramos ahora que la modulación se correlaciona de manera fuerte con la expresión de superficie de FcγRIIb, sin considerar el subtipo de célula, y la sobreexpresión es capaz de convertir células de Ramos a partir de moduladores lentos a rápidos. La internalización de FcγRIIb ocurrió junto con CD20 y fue precedida por su activación. En total estos datos proporcionan razones moleculares claras para la heterogeneidad observada previamente de velocidades de modulación tanto dentro como entre los diferentes subtipos de NHL.

Por lo tanto, ahora mostramos que sorpresivamente un factor clave que determina la efectividad de anticuerpos a antígenos tales como CD20 es la interacción con inhibidor de FcγRIIb (también conocido como (y que incluye) CD32, CD32B, CD32B1, CD32B2, FcRII, FcγRII o FcRIIb) sobre la superficie de la misma célula. Esta interacción conduce a la internalización de los anticuerpos por las células diana, lo cual elimina su capacidad de interactuar con receptores Fc de célula efectora. Además, demostramos que los agentes tales como mAb anti-CD32 son capaces de bloquear esta internalización. También demostramos que tales agentes pueden usarse en combinación con anticuerpos (tales como rituximab) para enfocarse en antígenos de superficie celular y mejorar su actividad in vivo para suprimir células B normales o células tumorales.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones acompañantes.

Según la invención se proporciona una composición que comprende;

(i) una molécula de un primer anticuerpo que se enlaza específicamente a antígenos de superficie celular de una célula diana y que es capaz de internalizarse en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb; dicho anticuerpo tiene un dominio Fc capaz de enlazarse a FcγRIIb en la que el antígeno de superficie celular se selecciona de CD19, CD20 o CD40; en combinación con

(ii) una molécula de un segundo anticuerpo que enlaza específicamente FcγRIIb, y que previene o reduce enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la primera molécula de anticuerpo; y la molécula del segundo anticuerpo es cualquiera de un anticuerpo; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo monocatenario; un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv o dAb;

y se caracteriza porque la composición es para su uso en el tratamiento de cáncer o de una enfermedad inflamatoria en un paciente con células diana que tienen un nivel elevado de expresión de FcγRIIb relativa a control, y el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad.

Según otro aspecto, la invención proporciona el uso de

(ii) una molécula de un segundo anticuerpo que se enlaza específicamente a FcγRIIb, y que impide o reduce el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la primera molécula de anticuerpo; y en la que la molécula del segundo anticuerpo es cualquiera de un anticuerpo; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo monocatenario; un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv o dAb,

que se caracteriza porque el uso es en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer o de una enfermedad inflamatoria del paciente con células diana que tiene un nivel elevado de expresión de FcγRIIb relativa a control y el control es el nivel de expresión mediano sobre el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad; y la molécula del segundo anticuerpo puede administrarse en combinación con

(i) una molécula de un primer anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno de superficie celular de una célula diana y que es capaz de internalizarse en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb; dicho anticuerpo tiene un dominio Fc capaz de enlazarse con FcγRIIb en la que el antígeno de superficie celular se selecciona de CD19, CD20 o CD40.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, un procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene células diana que expresan FcγRIIb, y el procedimiento comprende administrar (i) una molécula de anticuerpo que se enlaza específicamente a antígeno de superficie de la célula diana; dicha molécula de anticuerpo tiene un

dominio Fc capaz de enlazarse con FcγRIIb; en combinación con (ii) un agente que impide o reduce el enlace entre el dominio Fc de la molécula de anticuerpo y FcγRIIb; que se caracteriza porque el paciente se selecciona con base en que sus células diana expresan un nivel elevado de FcγRIIb.

5 En determinadas formas de realización de la composición para su uso o usos de la invención, la molécula del segundo anticuerpo impide o reduce que FcγRIIb, que está presente sobre la célula diana, se enlace al dominio Fc de la primera molécula de anticuerpo.

Según otro aspecto, la invención proporciona el uso de la expresión de FcγRIIb en células diana como un marcador de pronóstico para la respuesta de las células diana al tratamiento con

10 (i) una molécula de un primer anticuerpo que se enlaza específicamente a antígeno de superficie celular de una célula diana y que es capaz de internalizarse en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb; dicho anticuerpo tiene un dominio Fc capaz de enlazarse a FcγRIIb en la que el antígeno de superficie celular se selecciona de CD19, CD20 o CD40, por lo cual niveles elevados de FcγRIIb son indicativos de una reducción o la ausencia de una respuesta al tratamiento con la primera molécula de anticuerpo y en la que los niveles elevados de FcγRIIb son relativos a control; y el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de células en pacientes
15 que tienen la misma enfermedad.

En una forma de realización, el uso de expresión de FcγRIIb en células diana como un marcador de pronóstico no requiere el uso de expresión de FcγRIIc en células diana como un marcador de pronóstico.

Según otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para predecir la respuesta de células diana de un paciente al tratamiento con

20 (i) una molécula de un primer anticuerpo que específicamente se enlaza a antígenos de superficie celular de una célula diana y que es capaz de internalizarse en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb; dicho anticuerpo tiene un dominio Fc capaz de enlazarse a FcγRIIb en la que el antígeno de superficie celular se selecciona de CD 19, CD20 o CD40,

25 que se caracteriza porque el procedimiento comprende la determinación del nivel de expresión de FcγRIIb en las células diana, por lo cual niveles elevados de son relativos a control, y el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de células en pacientes que tienen la misma enfermedad y son predictivos de una reducción o la ausencia de una respuesta al tratamiento con la molécula del primer anticuerpo.

30 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) (es decir el segundo anticuerpo) impide o reduce que FcγRIIb, que está presente en la célula diana, se enlace al dominio Fc de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) (es decir el primer anticuerpo).

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) adicionalmente impide o reduce la internalización de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) en la célula diana.

Preferiblemente, la célula diana es una célula cancerosa.

Preferiblemente, la célula diana es una célula B.

35 Preferiblemente, el paciente que va a tratarse es un paciente con cáncer y el tratamiento es un tratamiento de cáncer.

Preferiblemente, el cáncer se selecciona de linfoma de no Hodgkin, tal como linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto o leucemia linfocítica crónica.

Preferiblemente, una o más moléculas de anticuerpo no incluyen un dominio capaz de captar una célula efectora.

40 Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo, una o más, son moléculas de anticuerpo monoclonal.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las siguientes CDRs:

(i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31; o

(ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37; o

45 (iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; o

(iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49; o

- (v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55; o
- (vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61; o
- (vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67; o
- (viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73; o
- 5 (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79; o
- (x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85; o
- (xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91; o
- (xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97; o
- (xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103;
- 10 y/o comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las siguientes CDRs:
- (i) SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o
- (ii) SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o
- (iii) SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
- (iv) SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
- 15 (v) SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o
- (vi) SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
- (vii) SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
- (viii) SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
- (ix) SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
- 20 (x) SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
- (xi) SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
- (xii) SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
- (xiii) SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.
- 25 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (VH) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; y SEQ ID NO: 15;
- 30 y/o comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 28.
- Preferiblemente, la molécula de anticuerpo, tal como se define en (ii) (es decir el segundo anticuerpo) comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR:
- (i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o
- (ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o
- 35 (iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
- (iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
- (v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o

- (vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
- (vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
- (viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
- (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
- 5 (x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
- (xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
- (xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
- (xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.
- 10 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:
- (i) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16; o
- (ii) SEQ IS NO: 4 y SEQ ID NO: 17; o
- (iii) SEQ IS NO: 5 y SEQ ID NO: 18; o
- 15 (iv) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 19; o
- (v) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 20; o
- (vi) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 21; o
- (vii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 22; o
- (viii) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 23; o
- 20 (ix) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 24; o
- (x) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 25 ; o
- (xi) SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 26; o
- (xii) SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 27; o
- (xiii) SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28.
- 25 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) es capaz de competir con los anticuerpos tal como se define en las reivindicaciones 14-16 para impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i).
- Preferiblemente, la molécula de anticuerpo definida en (ii) impide o reduce la señalización de FcγRIIb.
- 30 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) impide o reduce la internalización de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) por parte de la célula diana.
- Preferiblemente, el antígeno superficial celular es CD20 y la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) es un anticuerpo de CD20.
- Preferiblemente, el anticuerpo de CD20 es un anticuerpo de tipo ICD20.
- 35 En una forma de realización, el procedimiento para predecir la respuesta de células diana de un paciente comprende determinar el nivel de expresión de FcγRIIb en las células diana y no comprende adicionalmente determinar el nivel de expresión de FcγRIIc en las células diana.
- Ha sido demostrado que no todos los anticuerpos, a pesar de su dominio constante de anticuerpo que enlaza Fc común y conocida capacidad de enlace del Fc gamma receptor, se internalizan de una manera dependiente de FcγRIIb, lo que hace la identificación de anticuerpos adecuados crítica para el éxito terapéutico con terapia de

combinación que comprende reactivos que modulan la función de FcγRIIb e, inversamente, para impedir el tratamiento que no beneficiará pacientes.

5 En determinadas formas de realización de la composición para uso, o del uso de la invención, la molécula del segundo anticuerpo que impide o reduce el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula del primer anticuerpo adicionalmente impide o reduce la subsiguiente internalización de la molécula del primer anticuerpo en la célula.

En determinadas formas de realización de la composición para uso, o del uso de la invención, la célula diana es una célula cancerosa. De manera conveniente, la célula diana es una célula B.

10 Niveles elevados de expresión de FcγRIIb se definen más adelante en 'Definiciones'. El nivel de expresión de FcγRIIb puede medirse como una proporción de la intensidad fluorescente media geométrica (Geo MFI) de FcγRIIb para control de isotipo. De modo alternativo, los niveles de expresión de FcγRIIb pueden medirse mediante inmunohistoquímica de biopsias tumorales. Una persona experta en la técnica entendería que hay múltiples técnicas y metodologías para determinar niveles de expresión de FcγRIIb.

15 Aquí también se revela pero no se reivindica cómo identificar anticuerpos que son adecuados para tratamiento de combinación con anticuerpos de FcγRIIb, específicamente aquellos anticuerpos que se internalizan desde la superficie de célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb. En la presente memoria también se revela pero no se reivindica un medio para identificar subconjuntos de pacientes que son adecuados para tratamiento de combinación con anticuerpos de FcγRIIb.

20 Aquí también se revela pero no se reivindica un ensayo para identificar agentes que reducen o impiden el enlace entre el dominio de Fc de un anticuerpo a antígeno de superficie de células diana y FcγRIIb sobre la célula diana, el cual comprende determinar el alcance de enlace entre el dominio Fc y FcγRIIb en presencia y ausencia de un agente de ensayo. Agentes útiles se identifican si el agente de ensayo reduce o impide que el dominio Fc se enlace a FcγRIIb. Tales ensayos también son útiles para identificar cuáles agentes (por ejemplo moléculas de anticuerpo) son adecuados para terapia de combinación con anticuerpos anti-FcγRIIb.

25 El ensayo para identificar agentes útiles en la práctica de los usos de la invención incluye el tamizaje de agentes que bloquean la estimulación/señalización de FcγRIIb, tal como se indica mediante fosforilación de tirosina-293 en el motivo ITIM intracelular tal como se detecta mediante transferencia Western. Por ejemplo, las células de Raji se cultivan con un anticuerpo a antígeno de superficie celular, por ejemplo el mAb anti-CD20 rituximab, en presencia o ausencia del agente de ensayo anti-FcγRIIb antes del ensayo de inmunoblot para FcγRIIb fosforilado. La cantidad de FcγRIIb fosforilado se vuelve elevada en células estimuladas por rituximab, y debe inhibirse por la adición de los
30 agentes de ensayos similares a aquellos mostrados en la figura 4A usando AT10 como agentes de bloqueo. Además, preferiblemente estos agentes también deben bloquear la internalización de rituximab según el ensayo de extinción indicado en la figura 1A. La figura 2B muestra un ejemplo típico de bloqueo por una entidad de bloqueo anti-FcγRIIb, en este caso AT10. Tales ensayos también son útiles para identificar cuáles agentes (por ejemplo las moléculas del anticuerpo) son útiles para terapia de combinación con anticuerpos anti-FcγRIIb.

35 El ensayo usado para identificar agentes adecuados para la terapia de combinación con anticuerpos de FcγRIIb mide el porcentaje de internalización de agente (por ejemplo moléculas de anticuerpo) en las células que expresan FcγRIIb. Este procedimiento de ensayo comprende determinar el porcentaje de agente (por ejemplo moléculas de anticuerpo) retenido en la superficie celular que sigue a la incubación con agente (por ejemplo molécula de anticuerpo) de células que expresan la diana y expresan FcγRIIb, por lo cual el porcentaje decreciente de agente
40 (por ejemplo moléculas de anticuerpo) que son accesibles en la superficie celular (equivalente de internalización creciente de molécula de anticuerpo) es predictivo de una respuesta al tratamiento con la molécula de anticuerpo.

Neubig et al (2003) Pharmacol. Rev. 55, 597-606 describe diversas clases de ligandos que pueden seleccionarse para identificar agentes que impiden o reducen el enlace de FcγRIIb a dominio Fc de una molécula de anticuerpo.

45 Los ligandos antes mencionados pueden ser pequeños residuos orgánicos o inorgánicos tales como péptidos o polipéptidos. Cuando el ligando es un residuo orgánico o inorgánico, pequeño, puede tener un M_r desde 50 a 2000, tal como desde 100 a 1000, por ejemplo desde 100 a 500.

El ligando enlaza FcγRIIb con un K_d desde mM a pM, tal como el intervalo desde μ M (micromolar) a nM. En términos generales, se prefieren los ligandos con el K_d .

50 El ligando puede ser un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido péptido nucleico (PNA) o un aptámero. Puede ser un líquido o un carbohidrato.

El ligando puede ser un polipéptido que se enlaza a FcγRIIb. Tales polipéptidos (por los cuales incluimos oligopéptidos) normalmente son de M_r 500 a M_r 50,000, pero pueden ser más grandes.

El polipéptido también puede ser una proteína de enlace con base en un marco modular, tal como proteínas de repetición de ankyrina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetratriopéptidos o proteínas diseñadas de repetición de ankyrina (DARPin) o proteínas a base de dominios de lipocalina o fibronectina o matrices de Affilina.

- 5 De manera conveniente, el agente de ensayo es una biblioteca de compuestos de ensayo, por ejemplo la biblioteca es cualquiera de una biblioteca de péptidos, una biblioteca de proteínas, una biblioteca de anticuerpo, una biblioteca de anticuerpos recombinantes combinatorios o una biblioteca de indicación de fagos de scFV o Fab.

10 Preferiblemente, en una composición para su uso o uso según la invención, la molécula del segundo anticuerpo (ii) es una molécula, o más, del anticuerpo que se enlaza específicamente a FcγRIIb. De manera conveniente, las moléculas de anticuerpo, una o más, no incluyen un dominio capaz de captar una célula efectora.

De manera ventajosa, las moléculas de anticuerpo, una o más, son moléculas de anticuerpo monoclonal, una o más.

Preferiblemente, la molécula del segundo anticuerpo impide o reduce la señalización de FcγRIIb. Todavía más preferiblemente, la molécula del segundo anticuerpo impide o reduce la internalización de la molécula del primer anticuerpo por parte de la célula diana.

- 15 En las siguientes formas de realización, las SEQ ID NOs se refieren a las secuencias indicadas en los clones 1-13 de más adelante.

20 Tal como una persona experta estaría consciente, tres regiones que determinan complementariedad (CDRs) se encuentran presentes en los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la ligera de las inmunoglobulinas. La designación de aminoácidos a cada CDR descrita en la presente memoria es de acuerdo con las definiciones según Kabat EA et al. 1991, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest" quinta edición, NIH Publication No. 91-3242, pp xv-xvii.).

Tal como la persona experta estaría consciente, también existen otros procedimientos para designar aminoácidos a cada CDR. Por ejemplo, el sistema internacional ImMunoGeneTics (IMGT®) (<http://www.imgt.org/> y Lefranc y Lefranc "The Immunoglobulin FactsBook" publicado por Academic Press, 2001).

- 25 En una forma de realización, la molécula del segundo anticuerpo comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las siguientes CDRs:

(i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31; o

(ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37; o

(iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; o

- 30 (iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49; o

(v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55; o

(vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61; o

(vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67; o

(viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73; o

- 35 (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79; o

(x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85; o

(xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91; o

(xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97; o

(xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103.

- 40 Preferiblemente, la molécula del segundo anticuerpo comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las siguientes CDRs:

(i) SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o

(ii) SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o

- (iii) SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
- (iv) SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
- (v) SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o
- (vi) SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
- 5 (vii) SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
- (viii) SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
- (ix) SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
- (x) SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
- (xi) SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
- 10 (xii) SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
- (xiii) SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.

De manera opcional, la molécula del segundo anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (VH) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; y SEQ ID NO: 15.

Opcionalmente, la molécula del segundo anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 28.

20 Preferiblemente, la molécula del segundo anticuerpo comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR:

- (i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o
- (ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o
- (iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
- (iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
- 25 (v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o
- (vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
- (vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
- (viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
- (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
- 30 (x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
- (xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
- (xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
- (xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.

35 Aún más preferiblemente, la molécula del segundo anticuerpo comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16; o
- (ii) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 17; o

- (iii) SEQ IS NO: 5 y SEQ ID NO: 18; o
- (iv) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 19; o
- (v) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 20; o
- (vi) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 21; o
- 5 (vii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 22; o
- (viii) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 23; o
- (ix) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 24; o
- (x) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 25; o
- (xi) SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 26; o
- 10 (xii) SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 27; o
- (xiii) SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28.

La molécula del segundo anticuerpo de la invención también puede comprender las regiones constantes (CH) y (CL) de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

- 15 En otra forma de realización, la molécula del segundo anticuerpo es capaz de competir con los agentes descritos en la presente memoria, por ejemplo agentes que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las formas de realización anteriores (por ejemplo SEQ ID NOs: 1-106), para impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula del primer anticuerpo.

- 20 Por "capaz de competir" para impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula del primer anticuerpo con un agente (tal como una molécula de antígeno) como se define en la presente memoria se quiere decir que el agente ensayado es capaz de inhibir o de interferir de otra manera, al menos parcialmente, con el enlace de un agente tal como se define en la presente memoria a FcγRIIb e impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula del primer anticuerpo.

- 25 Por ejemplo, la molécula del segundo anticuerpo puede ser capaz de inhibir el enlace de un agente descrito en la presente memoria en al menos 10 %, por ejemplo al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso en 100 % y/o de inhibir la capacidad del agente para impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula del primer anticuerpo en al menos 10 %, por ejemplo al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso en 100 %.

El enlace competitivo puede determinarse mediante procedimientos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, tales como el ensayo por inmunoabsorción enlazado a enzima (ELISA).

- 30 Los ensayos ELISA pueden usarse para evaluar anticuerpos que modifican o bloquean epítipo. Procedimientos adicionales adecuados para identificar y cuerpos de competición se divulgan en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane (por ejemplo, véanse las páginas 567 a 569, 574 a 576, 583 y 590 a 612, 1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2).

- 35 La molécula del segundo anticuerpo de la invención puede comprender las siguientes regiones constantes (CH y CL):

IgG1-CH [SEQ ID NO: 1]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVP
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK

λ-CL [SEQ ID NO: 2]

ES 2 653 685 T3

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT
TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

La molécula del segundo anticuerpo de la invención puede comprender una o más secuencias de clones 1-14:

Clon 1

VH [SEQ ID NO: 3]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWRDAFDIWGQGTLVTVSS
FrH CDRH3 FrH4

5

-VL [SEQ ID NO: 16]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG
FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2 FrL3
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGSWVFGGGTKLTVLG
CDRL3 FrL4

Regiones CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 29]

10 CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 30]

CDRH3: EWRDAFDI [SEQ ID NO: 31]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 32]

CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 33]

CDRL3: AAWDDSLSGSWV [SEQ ID NO: 34]

15 Clon 2

- VH [SEQ ID NO: 4]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS TYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIAYDGSKKDYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYRDAFDI WGQGTLVTVSS

- VL [SEQ ID NO: 17]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTTA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSVSGWVFGGGTKLTVLG

20 Regiones CDR

CDRH1: TYGMH [SEQ ID NO: 35]

CDRH2: VIAYDGSKKDYADSVKG [SEQ ID NO: 36]

CDRH3: EYRDAFDI [SEQ ID NO: 37]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 38]

25 CDRL2: GNSNRPS [SEQ ID NO: 39]

CDRL3: AAWDDSVSGWV [SEQ ID NO: 40]

ES 2 653 685 T3

Clon 3

- VH [SEQ ID NO: 5]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNRYADSVKGRFTM
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRWNGMDVWGQGLTVTVSS

- VL [SEQ ID NO: 18]

5 QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPWVFGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 41]

CDRH2: VISYDGSNRYADSVKG [SEQ ID NO: 42]

CDRH3: DRWNGMDV [SEQ ID NO: 43]

10 CDRL1: SGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 44]

CDRL2: ANNQRPS [SEQ ID NO: 45]

CDRL3: AAWDDSLNGPWV [SEQ ID NO: 46]

Clon 4

- VH [SEQ ID NO: 6]

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDTAYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHSVIGAFDIWGQGLTVTVSS

- VL [SEQ ID NO: 19]

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEDEADYYCSSYAGSNNVVFGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 47]

20 CDRH2: VISYDGSDTAYADSVKG [SEQ ID NO: 48]

CDRH3: DHSVIGAFDI [SEQ ID NO: 49]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 50]

CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 51]

CDRL3: SSYAGSNNVV [SEQ ID NO: 52]

25 Clon 5

- VH [SEQ ID NO: 7]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQLGEAFDIWGQGLTVTVSS

- VL [SEQ ID NO: 20]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGPVFGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 53]

5 CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 54]

CDRH3: DQLGEAFDI [SEQ ID NO: 55]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 56]

CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 57]

CDRL3: ATWDDSLSGPV [SEQ ID NO: 58]

10 Clon 6

- VH [SEQ ID NO: 8]

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSSTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDIDYFDYWGQGTLTVSS

- VL [SEQ ID NO: 21]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

15 Regiones CDR

CDRH1: DYGMSS [SEQ ID NO: 59]

CDRH2: AISGSGSSTYYADSVKG [SEQ ID NO: 60]

CDRH3: GDIDYFDY [SEQ ID NO: 61]

CDRL1: TGSSSNFGAGYDVH [SEQ ID NO: 62]

20 CDRL2: ENNKRPS [SEQ ID NO: 63]

CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 64]

Clon 7

- VH [SEQ ID NO: 9]

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERRDAFDI WGQGTLTVSS

25 - VL [SEQ ID NO: 22]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCATWDS DTPV FGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 65]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 66]

CDRH3: ERRDAFDI [SEQ ID NO: 67]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 68]

5 CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 69]

CDRL3: ATWDSDTPV [SEQ ID NO: 70]

Clon 8

- VH [SEQ ID NO: 10]

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFS~~SYGMH~~WVRQAPGKGLEWVA~~VISYDGSNKYYADSVKG~~GRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMY~~YCAR~~~~DHSAAGYFDY~~WGQGTLLTVSS

10 - VL [SEQ ID NO: 23]

QSVLTQPPSASGTPGQ~~RVTIS~~C~~SGSSSNIGSNTVN~~WYQQLPGTAPKLLIY~~GNSIRPS~~GGPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEDEADYYC~~ASWDDSLSSPV~~FGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 71]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 72]

15 CDRH3: DHSAAGYFDY [SEQ ID NO: 73]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 74]

CDRL2: GNSIRPS [SEQ ID NO: 75]

CDRL3: ASWDDSLSSPV [SEQ ID NO: 76]

Clon 9

20 - VH [SEQ ID NO: 11]

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFG~~SYGMH~~WVRQAPGKGLEWVS~~GISWDSAIIDYAGSVKG~~GRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK~~DEAAAGAFDI~~WGQGTLLTVSS

- VL [SEQ ID NO: 24]

QSVLTQPPSASGTPGQ~~RVTIS~~C~~TGSSSNIGAGYDVH~~WYQQLPGTAPKLLIY~~GNTDRPS~~GVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYC~~AAWDDSLSGPVV~~FGGGTKLTVLG

Regiones CDR

25 CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 77]

CDRH2: GISWDSAIIDYAGSVKG [SEQ ID NO: 78]

CDRH3: DEAAAGAFDI [SEQ ID NO: 79]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 80]

CDRL2: GNTDRPS [SEQ ID NO: 81]

ES 2 653 685 T3

CDRL3: AAWDDSLSGPVV [SEQ ID NO: 82]

Clon 13

- VH [SEQ ID NO: 15]

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTLS~~SYGIS~~WVRQAPGKGLEWVS~~GISGSGGNTYYADSVKGR~~RFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS~~SVGAYANDAFDI~~WGQGTLTVSS

5 - VL [SEQ ID NO: 28]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT~~TGSSSNIGAGYDVH~~WYQQLPGTAPKLLIY~~GDTNRPS~~GVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCA~~AAWDDSLNGPV~~FGGGTKLTVLG

Regiones CDR

CDRH1: SYGIS [SEQ ID NO: 101]

CDRH2: GISGSGGNTYYADSVKG [SEQ ID NO: 102]

10 CDRH3: SVGAYANDAFDI [SEQ ID NO: 103]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 104]

CDRL2: GDTNRPS [SEQ ID NO: 105]

CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 106]

Clon 10

15 - VH [SEQ ID NO: 12]

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFS~~SYGMH~~WVRQAPGKGLEWMA~~VISYDGSNKYYADSVKGR~~RFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR~~ELYDAFDI~~WGQGTLTVSS

- VL [SEQ ID NO: 25]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT~~TGSSSNIGAGYDVH~~WYQQLPGTAPKLLIY~~ADDHRPS~~GVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCA~~ASWDDSQRAVI~~FGGGTKLTVLG

Regiones CDR

20 CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 83]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 84]

CDRH3: ELYDAFDI [SEQ ID NO: 85]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 86]

CDRL2: ADDHRPS [SEQ ID NO: 87]

25 CDRL3: ASWDDSQRAVI [SEQ ID NO: 88]

Clon 11

- VH [SEQ ID NO: 13]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRRFTISR
DNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGYIILDYWGQGTLTVVSS

- VL [SEQ ID NO: 26]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRDYERPSGVPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEDEADYYCMAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG

Regiones CDR

- 5 CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 89]
- CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 90]
- CDRH3: EFGYIILDY [SEQ ID NO: 91]
- CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 92]
- CDRL2: RDYERPS [SEQ ID NO: 93]
- 10 CDRL3: MAWDDSLSGVV [SEQ ID NO: 94]

Clon 12

- VH [SEQ ID NO: 14]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVRGRRFTISR
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETWDAFDVWGQGTLTVVSS

- VL [SEQ ID NO: 27]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSGSSSNIGSNNANWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSAS
15 LAISGLRSEDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLG

Regiones CDR

- CDRH1: NHGMH [SEQ ID NO: 95]
- CDRH2: VISYDGTNKYYADSVRG [SEQ ID NO: 96]
- CDRH3: ETWDAFDV [SEQ ID NO: 97]
- 20 CDRL1: SGSSSNIGSNNAN [SEQ ID NO: 98]
- CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 99]
- CDRL3: QAWDSSTVV [SEQ ID NO: 100]

Los antígenos de superficie de células diana divulgados en la presente memoria pero no reivindicados pueden seleccionarse de los siguientes: Thy-1 (CD90, Cluster of Differentiation 90 (Biofactors. 2009 mayo-junio; 35(3): 258-65)); Ly-6 (Lymphocyte Antigen 6 (Mol Biol Rep. 2009 abril; 36(4): 697-703)); CD59 (Complement regulatory protein (Mol Immunol. 2007 enero; 44(1-3): 73-81)); Fas (FS7-associated cell surface antigen, CD95, APO-1 o TNFRSF6 (Adv Exp Med Biol. 2009;647:64-93)); EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor (FEBS J. 2010 enero; 277(2): 301-8)); Her2 (Human epidermal growth factor receptor 2 (Clin Breast Cancer. 2008 octubre; 8(5):392-401)); CXCR4 (Chemokine Receptor 4 (Biochim Biophys Acta. 2007 abril; 1768(4): 952-63)); HLA Molecules (Human Leukocyte Antigen molecules (Korean J Lab Med. 2010 junio; 30(3):203)); GM1 (ganglioside, monosialotetrahexosylganglioside (J Lipid Res. 2010 septiembre; 51(9):2731-8)); CD22 (Cheson (2008) NEJM 359(6): 613-26); CD23 (Cheson, 2008); CD80 (Cheson, 2008); CD74 (Cheson, 2008); DRD (Cheson, 2008).

Tal como se define en las reivindicaciones, el antígeno de superficie de célula diana se selecciona de: CD 19 (Cluster of Differentiation 19 (Cell Immunol. 1989 febrero; 118(2):368-81)); CD40 (Cluster of Differentiation 40 (Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009 febrero; 104(2):87-92)); y CD20.

5 Preferiblemente, los antígenos de superficie CD19, CD20, o CD40 son formas humanas de los mismos. CD20, especialmente CD20 humano, es el más preferido.

De manera ventajosa, la molécula del primer cuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que después de enlazarse a la célula diana se retira de la superficie celular y se internaliza en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIIb. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-CD19, anti-CD20 o anti-CD40. Del modo más preferible, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

En una forma de realización preferida, la molécula del primer anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20 de tipo I. En otra forma de realización preferida, la molécula del primer anticuerpo no es un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

En una forma de realización, el antígeno de superficie celular es CD20 y la molécula del primer anticuerpo es un anticuerpo tipo I.

15 Tal como se mencionó antes, hay dos tipos de anticuerpos monoclonales anti-CD20 (mAb). mAb anti-CD20 fueron definidos primero por los inventores como ubicados en diferentes grupos en 2003 (43 y 25) y luego definidos a continuación como mAbs de tipo I y II en 2004 (26). Inicialmente, la base para esto fue que mAb anti-CD20 se ubicó en dos tipos distintos de reactivos con base en su capacidad para erradicar xenoinjertos de linfoma: los del tipo I (por ejemplo Rituximab y 1F5) utilizan complemento; y los del tipo II (por ejemplo B1), no utilizan. Ambos tipos de mAb dieron una prolongación excelente de supervivencia, pero agotaron la actividad de complemento administrando CVF, disminuyeron considerablemente la potencia de Rituximab y 1F5, pero no tuvieron efecto en la actividad de B1. Estos resultados mostraron claramente que diferentes mAb de CD20 operan diferentes mecanismos efectores in vivo. Además, se encuentran completamente de acuerdo con un trabajo previo que mostraba que Rituximab y 1F5 son capaces de activar el complemento de manera eficiente como resultado de transferir CD20 a balsas lipídicas en la membrana de la célula diana, algo que no puede hacer el mAb de tipo B1 (43). Existe una correlación excelente con la capacidad de mAb para involucrar el complemento e inducir CD20 para moverse a balsas lipídicas (43, 26). Por lo tanto, la naturaleza de tipo I y II puede definirse por su capacidad para mover CD20 a balsas lipídicas. Esto puede determinarse tal como se indica más adelante. También existe una correlación con mAb de tipo II que es capaz de provocar una adhesión homotípica más potente y muerte celular directa, pero esta no puede usarse sola para definir un mAb de tipo I o II (a diferencia de los ensayos de balsa Tx-100; véase más adelante).

Por lo tanto, diversos mAbs anti-CD20 pueden clasificarse como tipo I (por ejemplo rituximab, ofatumumab) o tipo II (por ejemplo tositumomab (B1), GA101, 11B8) de acuerdo con su capacidad para redistribuir CD20 en la membrana plasmática y su actividad en diversos ensayos efectores (25-27). Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 del tipo I (por ejemplo rituximab, ofatumumab) inducen CD20 para que se redistribuya en grandes microdominios (balsas) resistentes a detergente, mientras que los anticuerpos monoclonales anti-CD20 de tipo II (similares a tositumomab) no inducen (50).

Tal como se ha discutido antes, los mAbs anti-CD20 pueden designarse como de tipo I o tipo II por virtud de si redistribuyen CD20 en balsas lipídicas. Esto se hace mediante el ensayo de indisolubilidad de Tx-100 o mediante separación de gradiente de densidad de sacarosa y transferencia Western. Ambos procedimientos se describen en Cragg et al Blood 2003 (43) tal como sigue:

1. Evaluación de antígeno asociado a balsa mediante insolubilidad de Triton X-100

Como una evaluación rápida de la presencia de antígeno en microdominios de balsa utilizamos un procedimiento de citometría de flujo basado en la insolubilidad de Triton X-100 a bajas temperaturas. Brevemente, las células fueron lavadas en RPMI / BSA de 1 % y resuspendidas a $2,5 \times 10^6$ /ml. Las células fueron incubadas luego con 10 µg/ml de un mAb conjugado con FITC durante 15 minutos a 37 °C, fueron lavadas en PBS frío/BSA de 1 % /azida de sodio de 20 mM y luego la muestra se dividió en la mitad. Se mantuvo una mitad sobre hielo para permitir el cálculo de niveles de antígeno de superficie de 100 %, mientras que la otra fue tratada con Triton X-100 al 0,5 % durante 15 minutos sobre hielo para determinar la proporción de antígenos que permanecen en la fracción de balsa insoluble. Las células se mantuvieron luego a 4 °C durante todo el resto del ensayo, se lavaron una vez en PBS/BSA/azida, se resuspendieron y evaluaron mediante citometría de flujo tal como se ha detallado antes. Fueron obtenidos resultados similares usando procedimientos indirectos de detección. Para determinar el nivel constitutivo de asociación de balsa de antígenos diana, primero se trataron las células con Triton X-100 de 0,5 % durante 15 minutos sobre hielo y se lavaron en PBS/BSA/azida antes del enlace de mAb etiquetado con FITC. Para evaluar si podía moverse más antígeno a la fracción insoluble de Triton X-100 mediante entrecruzamiento adicional, las células fueron incubadas con mAb FITC al igual que antes, lavadas y luego divididas en 4. Dos de estas muestras fueron incubadas con fragmentos de F(ab')₂ de Ig cabra anti-ratón durante 15 minutos sobre hielo. Después de lavar, una

de las muestras entrecruzadas y una de las muestras no entrecruzadas fueron lisadas en Triton X-100 y lavadas tal como se describió antes, previamente a la citometría de flujo.

2. Separación de gradiente de densidad de sacarosa y transferencia Western - Preparación de fracciones de balsa lipídica y transferencia Western

5 Ab (anticuerpo) monoclonal (1 μg /10⁶ células) fue adicionado a las células a 37 °C. 20 minutos después de la incubación, las células fueron convertidas en pellas y lisadas en Triton X-100 de 1,0 %, helado, en salmuera con pH regulado por MES (MES de 25 mM, pH 6,5, NaCl de 150 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo de 1mM, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, EDTA de 10 mM). Luego fueron preparadas fracciones de balsa lipídica por centrifugación de gradiente de densidad de sacarosa. En breve fueron mezclados los lisados con un volumen igual
10 de sacarosa al 80 % en regulador de pH de lisis, recubiertos con un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa de 5-30 % y luego centrifugados a 200000 x g durante 16 h. Se recogieron y analizaron fracciones (0,5 ml) mediante transferencia Western. Fueron diluidas alícuotas de 15 ml de cada fracción 1:1 en regulador de pH de carga 2 x, calentadas a 95 °C por 5 minutos y separadas sobre geles de SDS-PAGE de 15 %, antes de transferirse a otras membranas de PVDF e incubarse con el anticuerpo primario (por ejemplo ratón anti-CD20, Clon 7D1 para detectar CD20 o polisueros de conejo anti-Lyn; Serotec, Reino Unido para identificar las fracciones de balsa), seguido por anticuerpo secundario conjugado con HRP (Amersham Biosciences UK Ltd). Fueron visualizados manchas usando ECL+plus (Amersham Biosciences UK Ltd).

mAbs anti-CD20 pueden requerir el motivo AxP en el bucle grande de CD20. (Ofatumumab y otros anticuerpos Genmab no requieren). Sin embargo, (Niederfelner et al. (51)) indica que un mAb de tipo II se enlaza a una región
20 ligeramente diferente del bucle CD20 en comparación con el tipo I.

Preferiblemente, en una composición, uso o procedimiento según la invención, la célula diana es una célula cancerosa. Más preferiblemente, un cáncer seleccionado del linfoma de no Hodgkin, que incluye pero no se limita a linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula del manto o leucemia linfocítica crónica.

En una forma de realización, la invención proporciona composiciones para su uso y usos para tratar cáncer, en particular una malignidad de células B que se selecciona preferiblemente de linfomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular con áreas de linfoma difuso de células B grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto y linfoma difuso de células disociadas pequeñas o combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, la malignidad de células B es un linfoma tal como un linfoma de no Hodgkin
30 (NHL).

En otra forma de realización la invención proporciona composiciones para su uso y usos para tratar una enfermedad inflamatoria. Esta puede ser una enfermedad autoinmune tal como tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Adison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune del oído interno, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa o combinaciones de las mismas. En formas específicas de realización, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

En formas preferidas de realización, el tratamiento es para enfermedades que incluyen leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de no Hodgkin (NHL), malignidades de célula B, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, esclerosis sistémica y enfermedades ampollosas autoinmunes.

En una forma preferida de realización, el tratamiento que se mejora por el uso de la invención es el tratamiento con un mAb anti-CD20, tal como rituximab.

DEFINICIONES

Por "elevado" incluimos el significado de que las células en cuestión expresan niveles más altos de Fc γ RIIb sobre sus superficies que las células de control o de referencia que expresan niveles bajos o medios de Fc γ RIIb en su superficie. Por ejemplo, si las células en cuestión son un tipo de célula B, niveles "elevados" de expresión de Fc γ RIIb serían reconocidos si el nivel de expresión fuera superior al nivel normal (preferiblemente mediano) de expresión de Fc γ RIIb por células B del mismo tipo celular. Como alternativa, niveles "elevados" serían reconocidos y las células en cuestión expresarían Fc γ RIIb a un nivel superior que un tipo de célula diferente que expresa Fc γ RIIb a nivel bajo o medio.

Según la invención, mientras mayor sea el grado de elevación en la expresión de Fc γ RIIb de células diana, peor es la respuesta predicha de dichas células al tratamiento con una molécula de anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno de superficie de las células diana y que tiene un dominio Fc capaz de enlazar Fc γ RIIb. Por lo tanto, mientras mayor sea la elevación en la expresión de Fc γ RIIb, mayor será el beneficio que puede ganarse del uso de un agente que impide o reduce el enlace del dominio Fc a Fc γ RIIb según la invención, tal

como se demuestra en las figuras 2D y 3A. Después de medir los niveles de FcγRIIb mediante IHC (Figura 10b) y de separar muestras de MCL en positivas y negativas para FcγRIIb, se vio una diferencia clínica clara en respuesta después de la terapia a base de rituximab. (Figuras 10c y d)

5 Las personas expertas pueden determinar fácilmente los niveles de expresión de FcγRIIb en células mediante una variedad de procedimientos conocidos tales como la citometría de flujo y los procedimientos de tinción inmunohistoquímica que se describen en las figuras y ejemplos acompañantes.

10 Una persona experta apreciaría que el nivel de expresión "normal" y "elevado" de FcγRIIb variará entre diferentes tipos de células y diferentes estados de enfermedad y sería capaz de identificar un nivel "normal" y uno "elevado" de expresión de FcγRIIb para una célula diana dada o un estado patológico usando procedimientos bien conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. Se proporcionan niveles ejemplares de los niveles "normales" (o medianos) y "elevados" de expresión de FcγRIIb en ciertos tipos de células en la figura 2C. En estos ejemplos particulares, en linfoma folicular (FL), niveles "normales" son aproximadamente de 50 (proporción de Geo MFI FcγRIIb a control isotópico) y niveles "elevados" son aproximadamente de 125 o 400 o más, mientras que en el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), niveles "normales" son aproximadamente de 20 y niveles "elevados" son aproximadamente de 80 o más, mientras que en linfoma de célula de manto (MCL) niveles "normales" son aproximadamente de 60 y niveles "elevados" son aproximadamente de 110 o de 190 o más, y en leucemia linfocítica crónica (CLL) niveles "normales" son aproximadamente de 100 y niveles "elevados" son aproximadamente de 300 o más.

20 Preferiblemente, el nivel elevado de expresión de FcγRIIb es de al menos 1,1 veces incrementado sobre el nivel de expresión mediano de células del mismo tipo de células en pacientes que tienen la misma enfermedad, o de al menos 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0 o 25,0 o más veces incrementado sobre el nivel mediano de expresión de células del mismo tipo de células en pacientes que tienen la misma enfermedad. Preferiblemente son de al menos 1,8 veces incrementados sobre el nivel de expresión mediano de células del mismo tipo de células en pacientes que tienen la misma enfermedad.

30 Tal como se muestra en los ejemplos acompañantes, mentores han determinado que el nivel de expresión de FcγRIIb se correlaciona con una modulación incrementada de mAb desde la superficie de la célula. Más altos de expresión de FcγRIIb dan una modulación aún más alta, es decir que existe una correlación entre el grado de elevación de expresión y la modulación tal como se muestra en las figuras 2D y 3A. En la figura 2D se grafica el nivel de expresión de FcγRIIb versus el nivel de modulación observado. La correlación es tal que los niveles más altos de FcγRIIb (por ejemplo >400) da lugar al nivel más bajo de CD20 superficial (<20 %); es decir el efecto más grande sobre la modulación de mAb desde la superficie de la célula. En la figura 3A, se introdujeron niveles bajo (18), medio (70) y alto (124) de FcγRIIb a una línea celular negativa de FcγRIIb (Ramos) y esta fue correlacionada directamente con la reducción de niveles de la superficie celular CD20 (60, 40, 30 % para bajo, medio y alto) en proporción con la expresión de los niveles de expresión de FcγRIIb. FcγRIIb tal como se da por la proporción de la intensidad fluorescente media geométrica (Geo MFI) de FcγRIIb al control isotópico.

40 La modulación reduce la cantidad de mAb que queda sobre la superficie celular. mAbs requieren que Fc se involucre con mecanismos inmuno-efectores (ADCC, ADCP, CDC) para suprimir células diana. Por lo tanto, reducir la modulación con mAb que bloquea FcγRIIb mejorará las funciones efectoras dependientes de Fc. Esto se muestra para ADCP (fagocitosis) en la figura 8. La fagocitosis con solamente rituximab fue de 40 % pero creció a 55 % cuando el FcγRIIb fue bloqueado por AT10.

45 Por "molécula de anticuerpo" incluimos anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos producidos de modo recombinante, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de camélidos, anticuerpos, Fvs (scFv) monocatenarios, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), Fvs enlazados con disulfuro (sdFv), intracuerpos, o fragmentos que enlazan epítope de cualquiera de los anteriores. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales y más preferiblemente anticuerpos humanizados o humanos.

55 Procedimientos para la preparación y caracterización de moléculas de anticuerpo que son útiles en las composiciones para su uso y el uso de la presente invención son bien conocidos por las personas expertas. Por ejemplo, la publicación WO 2008/002933, en la sección 5,3 a 5,3.1 páginas 74-91, describe la preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a un antígeno superficial de célula diana tal como CD20 o FcγRIIb. Anticuerpos útiles que se enlazan específicamente a FcγRIIb y CD20, que incluyen anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, depositados según el tratado de Budapest, también se revelan en las páginas 15-21 de la publicación WO 2008/002933.

Por "que se enlaza específicamente" hemos incluido agentes tales como moléculas de anticuerpo que se enlazan a un antígeno diana pero no se enlazan (reacción cruzada) a otros antígenos o se enlazan a tales antígenos más débilmente, es decir con una afinidad más baja que el antígeno diana. Por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente a FcγRIIB puede enlazarse a otros péptidos o polipéptidos con afinidad más baja, tal como se determina, por ejemplo, mediante inmuno-ensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, los anticuerpos que se enlazan específicamente a FcγRIIB o a un fragmento del mismo no reaccionan de modo cruzado con otros antígenos. Los anticuerpos que se enlazan específicamente a FcγRIIB pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmuno-ensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Un anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza específicamente a un FcγRIIB cuando se enlaza a FcγRIIB con una afinidad superior que a un antígeno reactivo de modo cruzado, según se determina usando técnicas experimentales tales como transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA) y ensayos por inmunabsorción enlazado a enzimas (ELISAs) (véase *Fundamental Immunology*, segunda edición, Raven Press, Nueva York, en las páginas 332-336 (1989) para una discusión respecto de la especificidad de anticuerpo) y se enlaza a FcγRIIB, particularmente FcγRIIB humano, más particularmente FcγRIIB humano nativo, con una afinidad superior con la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIA, particularmente FcγRIIA humano, más particularmente FcγRIIA humano nativo. Se divulgan anticuerpos representativos en las solicitudes estadounidenses de patente Nos. 2004-0185045; 2005-0260213; y 2006-0013810.

Preferiblemente, determinados anticuerpos de FcγRIIB que se usan en combinación con un anticuerpo de CD20 en las composiciones para su uso de la invención se enlazan al dominio extracelular de FcγRIIB humano nativo. En algunas formas de realización, el anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIB con una afinidad al menos 2 veces más grande que con la que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIA. En otras modalidades, el anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza 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 1000 veces, al menos 104, al menos 105, al menos 106, al menos 107, o al menos 108 veces más grande que aquella con la que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIA. En una forma preferida de realización, dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIB con una afinidad 100 veces, 1000 veces, 104 veces, 105 veces, 106 veces, 107 veces, 108 veces más grande que con la que dicho anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza a FcγRIIA.

Ejemplos

Ejemplos que materializan aspectos de la invención serán descritos ahora con referencia a las figuras acompañantes, en las cuales:-

Figura 1. mAb de tipo I se internaliza desde la superficie celular de células B humanas, normales y malignas.

A) Fueron cultivadas células primarias de CLL con Tosit-488, GA101gly-488, Ritux-488 o Ofatum-488 (todas a 5 µg/ml) durante 2 o 6 h. Luego las células fueron cosechadas y lavadas dos veces antes de adición de anti-Alexa-488 a una mitad de la muestra durante 30 minutos a 4 °C para discriminar entre mAb internalizado y no internalizado. Fue determinado CD20 (%) accesible en la superficie usando el siguiente cálculo: $\text{CD20 accesible en la superficie} = \frac{\text{Geo MFI pre-extinción} - \text{Geo MFI pos-extinción}}{\text{Geo MFI pre-extinción}} \times 100$. Cada punto representa una muestra de un paciente diferente con CLL. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba emparejada de Wilcoxon, valor $^{**}p < 0,001$, y se muestran las medianas. B) Luego se examinó una variedad de tumores de células B primaria y células B normales de voluntarios sanos en el mismo ensayo con Tosit-488 o Ritux-488. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba de Mann Whitney y se muestran las medianas.

Figura complementaria 1. Falta de correlación entre modulación de CD20 y marcadores fenotípicos/de pronóstico de CLL. a) Correlación entre modulación y factores conocidos de pronóstico de CLL: fueron fenotipados casos de CLL para el estado mutacional del gen IgVH, expresión de Zap-70 y CD38, y fueron realizados ensayos de internalización en estas muestras para evaluar la modulación tal como en la figura 1a). Se realizó la correlación entre cada característica de pronóstico y la modulación de CD20 mediante el análisis de correlación de Spearman. No se vio una correlación con cada factor de pronóstico ($p > 0,05$). b) De manera similar, fueron evaluados el estatus de slg, la capacidad de las células para provocar flujo de calcio y la viabilidad de las células de CLL, y comparados con la modulación de CD20. Una vez más no se vio una correlación. c) se evaluó la expresión de CD20 de las células de CLL mediante FACS usando Ritux-488, y se comparó con la modulación de CD20. Fue vista una correlación débil (valor r de Spearman -0,34, $p = 0,038$). El análisis subsiguiente usando regresión multivariada de expresión de CD20 y FcγRIIB frente a la modulación de CD20 mostró que la correlación débil con CD20 no fue significativa ($p = 0,638$). d) la expresión slg de casos de CLL IgM-positivos fueron determinados mediante FACS y el nivel de expresión comparado con la modulación de CD20. No se encontró una correlación ($p > 0,05$). e) Se cultivaron casos de CLL con Rit m2a-488 durante 2 h y se realizó el ensayo de internalización tal como en la figura 1a). Dentro de un caso sencillo de CLL se vio variación en la expresión de CD38. Los gráficos de FACS muestran muestras antes de la extinción (izquierda) y pos-extinción (derecha). Los histogramas correspondientes resaltan que las células de CD38⁺ve y CD38⁻ve dentro de una sola muestra modularon a la misma velocidad. Las células de CD38⁺ve y CD38⁻ve se representan mediante picos sólidos y huecos, respectivamente. Estos resultados son representativos de 3 casos diferentes.

Figura 2. Modulación es un procedimiento dependiente de Fc. A) El ensayo de internalización descrito en 1a) fue repetido después de cultivar células de CLL durante 6 h con fragmentos etiquetados Alexa-488 de rituximab; Fab', F(ab')₂ y IgG. Los datos representan los niveles medios de modulación +/- SD para 3 muestras diferentes de CLL. B) Fueron cultivadas células de CLL con Tosit-488, Ritux-488 +/- AT10 y Rit m2a-488 tal como en 1a) durante 2 y 6 h. Se muestra promedio +/- modulación de 6 diferentes muestras de CLL. La adición de mAb anti-FcγRII AT10, a rituximab, redujo la modulación de CD20 a niveles similares a Rit m2a, mientras que la adición de AT10 a Rit m2a no hizo una diferencia significativa a la modulación. C) Fue teñida una variedad de muestras de células B, normales y malignas para expresión de FcγRIIb con AT10-PE. El histograma muestra la diversidad de expresión de FcγRIIb en 3 diferentes casos de CLL, lo cual representa agentes de expresión nominales altos (línea negra), medios (línea gris oscuro) y bajos (línea gris claro). La gráfica de dispersión muestra diferencias en la expresión de FcγRIIb a través de células B sanas, CLL, SLL, MCL, FL y SLBCL. La expresión de FcγRIIb fue expresada como una proporción de FcγRIIb: control de isotipo Geo MFI para controlar pequeñas diferencias debido a la variación inter-experimental. Los valores medianos se muestran. D) Fue graficada la expresión de FcγRIIb frente a la modulación de CD20 a través de todos los subtipos de NHL y células B normales (obtenidas del ensayo de internalización que fue descrito en 1A) y co-cultivadas con Ritux-488 durante 6 h). Se realizó un análisis usando una correlación de Spearman suponiendo una distribución no-paramétrica. Fue demostrada una fuerte correlación. Valor r de Spearman = -0,74, 95 % de intervalo de confianza entre -0,83 y -0,61 y p<0,0001.

Figura 3. La expresión de FcγRIIb es un gran determinante de modulación de CD20. A) las células de Ramos transfectadas con FcγRIIb fueron clasificadas para expresar niveles bajo, medio y alto de FcγRIIb y evaluados en el ensayo de internalización usando Tosit-488 y Ritux-488 en el punto de tiempo de 6 h junto a células transfectadas por imitación. Las barras representan valores medios +/- SD de experimentos independientes. Los valores de Geo MFI para expresión de FcγRIIb de las células clasificadas se listan a la derecha. B) El ensayo de internalización fue repetido usando Tosit-488 y Ritux-488 en células normales de Ramos, células Rx3 (las cuales carecen de expresión de BCR), células Rx3 transfectadas por imitación y células Rx3 transfectadas por FcγRIIb siguiendo una incubación de 6 horas. Los puntos de datos de 5 experimentos independientes se muestran junto con el valor mediano.

Figura 4. La co-ligación de CD20 y FcγRIIb ocurre de manera predominante de una manera cis y conduce a la activación de FcγRIIb. A) Las células de Raji fueron cultivadas con el mAb especificado (10 µg /ml) durante 2 h a 37 °C antes de cosecha, lisis e inmunoblotting subsiguiente para FcγRIIb fosforilado. B) Panel izquierdo; células de Ramos etiquetadas con PKH26 (FcγRIIb-ve, R1) fueron mezcladas 1:1 con transfectantes de Ramos que expresan FcγRIIb clasificados (R2) (descritas en la figura 3A). Panel derecho; modulación de CD20 en células de FcγRIIb^{+ve} y FcγRIIb^{-ve} después del cultivo con Ritux-488 durante 6 h. Como controles, ambas poblaciones también fueron cultivadas solas. Los datos representan los niveles medios de modulación +/- SD a partir de 3 experimentos independientes. C) en un experimento similar, una CLL que expresa FcγRIIb bajo fue etiquetada con PKH26, luego mezclada 1:1 con una CLL que expresa FcγRIIb más alto. El experimento fue realizado tres veces, cada vez con una CLL que expresa FcγRIIb alto diferente. Los niveles de FcγRIIb (Geo MFI) fueron de 42 (bajo) y 275,306 y 165 para los agentes de alta expresión. El ensayo de internalización se realizó luego como en 4B. Los datos representan los niveles medios de modulación +/- SD. D) Fueron cultivadas diferentes muestras de CLL con Ritux-488 durante 6 h a 20, 4 y 1 x 10⁵ células/ml, y el ensayo de internalización fue realizado a 6 horas tal como antes. E) Fueron cultivadas células de Raji a 20, 4, y 1 x 10⁵ células/ml con el mAb especificado (10 µg /ml) durante 2 h a 37 °C. Fueron capturadas imágenes usando un microscopio de campo claro para demostrar las diferencias en la proximidad de la célula. Luego, las células se cosecharon y se evaluaron mediante inmunoblotting para FcγRIIb fosforilado, tal como se describe en 4A.

Figura 5. Rituximab, CD20 y FcγRIIb se internalizan juntos en lisosomas. A) Fueron incubadas células de CLL con cualquiera de Tosit-488 o Ritux-488 durante 2 h y luego teñidas con anti-CD19-APC y AT10-PE. Los datos muestran el promedio +/-1 SD para expresión de FcγRIIb como un % de no tratadas (n+6 muestras de CLL). Expresión de FcγRIIb después de Ritux-488 fue significativamente más baja que después de Tosit-488, * p<0,05. B) Células de CLL fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas antes de teñir con AT10-647 (azul), lavado y análisis con microscopía confocal. Esta imagen representa el patrón de teñido de FcγRIIb en células no estimuladas. C) La misma muestra de CLL fue cultivada con Ritux-488 durante 30 min, luego tratada tal como se describe en 5b). Las células en este punto del tiempo mostraron co-localización obvia entre Ritux-488 (verde) con AT10-647 (azul). D) Las células de CLL fueron incubadas con Tosit-488 por 6 h antes de la preparación para la microscopía tal como en 5B. Adicionalmente, también fueron teñidas las células con LAMP-1 biotinilado y estreptavidina-546 (rojo) para teñir por lisosomas. Tosit-488 se mantuvo uniformemente sobre la superficie y el teñido de AT10-647 no fue modificado a partir de la línea de base vista en 5B. No hubo co-localización con LAMP-1. E) Las células de CLL fueron tratadas con Ritux-488 por 6 h y evaluadas tal como en 5D). Aquí se muestran dos células representativas. La célula superior muestra co-localización inequívoca entre Ritux-488 y AT10-647, pero no co-localización con LAMP-1. La célula de fondo muestra co-localización de todos los tres fluorocromos. En cada caso, la imagen de campo claro (BF) es mostrada desde la misma célula. Las barras de la escala representan 5 µm.

Figura 6. La carencia de receptor inhibitor aumenta la capacidad de agotamiento de mAb anti-CD20. Ratones Tg de hCD20 (WT) o ratones Tg de hCD20 que carecen de CD32 (CD32KO) fueron tratados con variantes de rituximab que albergan ratón IgG1 (m1) o ratón IgG2a (m2a); 250 mg iv y luego agotamiento de células B monitoreado por citometría de flujo durante 90 días mediante sangrado en serie de los ratones y tinturado con B220 y CD 19 mAb.

Figura 7. Bloqueo del receptor inhibidor CD32b (FcγRIIb) aumenta la eficacia de mAb anti-CD20 en un sistema humano de xenoinjerto. Células tumorales humanas CD20 positivas (Daudi o Raji) fueron inoculadas en ratones SCID y luego tratadas con cualquiera de rituximab, AT10 o con ambos y fue monitoreada la supervivencia de los ratones o el crecimiento tumoral. Las dosis de mAb usado se muestran en las leyendas de la figura. En A) fueron inoculadas células de Daudi subcutáneamente y el tumor fue monitoreado mediante mediciones con calibrador cada 305 días. En B) y C) las células de Raji fueron inoculadas por vía intravenosa.

Figura 8. Fagocitosis mejorada de células de CLL tratadas con rituximab mediante co-incubación con un mAb que bloquea FcγRII. Los monocitos fueron derivados de voluntarios sanos y diferenciados en macrófagos con M-CSF en una placa de 6 pozos por un período mínimo de 7 días antes de su uso. Luego los macrófagos fueron cosechados y se permitió que se adhirieran en una placa de 96 pozos a 5×10^5 células/pozo por un mínimo de 2 horas antes de la adición de células de CLL etiquetadas con CFSE. Las células de CLL etiquetadas con CFSE no fueron tratadas u opsonizadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de rituximab (ritux) y el mAb AT10 (fab')₂ que bloquea FcγRIIb durante ya sea 15 minutos o 6 horas antes de lavar dos veces y adicionar a macrófagos (proporción 1:1) por al menos 30 minutos. F(ab)₂-APC anti-CD16 ($5 \mu\text{g/ml}$) se adicionó luego a cada pozo durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) para teñir macrófagos y luego los pozos se lavaron una vez con lavado de Facs (PBS BSA azida) a RT. Luego se adicionó lavado FACS helado y la placa incubadas sobre hielo durante 10 minutos antes de cosechar para análisis mediante Facs. % de macrófagos doble positivos representan % de células CD16+CFSE+ positivas, expresadas como un total de % de células CD16+. N=3 replicados, la línea representa el promedio. Los datos muestran claramente que la fagocitosis de células de CLL es más alta cuando ha sido adicionado el rituximab solamente por 15 minutos, en comparación con 6 h. Esta reducción en la eficacia se asocia con la modulación del rituximab de la superficie celular y puede revertirse mediante tratamiento con el mAb AT10 que bloquea FcγRIIb. De manera importante, el mAb de FcγRIIb se adiciona solamente a las células de CLL y de esta manera no tiene efecto en los macrófagos mismos. Además, solamente se usan fragmentos Fab2 de AT10 y por lo tanto no puede ocurrir una fagocitosis incrementada como resultado en más mAb que se enlaza a la superficie celular de CLL. Esta conclusión también se apoya por la observación de que no se observa incremento en fagocitosis siguiente a la incubación por sólo 15 minutos (un tiempo en el cual habría ocurrido muy poca modulación de rituximab).

Figura 9. Expresión de FcγRIIb mediante IHC. Los tejidos incrustados en parafina fueron teñidos para expresión de FcγRIIb usando mAb específico anti-CD32b, EP888Y. Se muestran las imágenes de 4 diferentes pacientes con FL (x40 de magnificación total, y x150 de magnificación insertada). También fue examinada la expresión de FcγRIIb mediante citometría de flujo teñiendo y haciendo coincidir células viables con AT10-PE. Se muestra la expresión de FcγRIIb obtenida mediante citometría de flujo en la esquina superior izquierda de cada imagen.

Figura 10. Los niveles de FcγRIIb predicen el resultado clínico en pacientes con MCL tratados con rituximab. Como demostración conceptual de nuestros hallazgos in vitro, examinamos de modo retrospectivo la expresión de FcγRIIb de un grupo de pacientes con MCL que habían recibido rituximab. El tejido de diagnóstico, incrustado en parafina, fue teñido mediante inmunohistoquímica usando un mAb específico de FcγRIIb (Figura 11). Fue visto un teñido de membrana fuerte en FcγRIIb^{+ve} pero no muestras de linfoma de FcγRIIb^{-ve}. El teñido de FcγRIIb mostrado en las figuras 10a y b mediante IHC fue correlacionado con la expresión de FcγRIIb mostrada mediante citometría de flujo, tal como se muestra en la figura 2D (con el valor determinado mediante citometría de flujo en 2D mostrado como el número incrustado en las figuras 10a y b). Estos resultados fueron correlacionados con la expresión de FcγRIIb de muestras correspondientes congeladas con DMSO, obtenidas mediante citometría de flujo (Fig. 2C, valores insertados). A pesar de estudiar solamente un pequeño grupo de 16 pacientes con MCL, los pacientes con linfoma de FcγRIIb-ve tuvieron una supervivencia libre de progreso mediano significativamente mejor que aquellos con células de FcγRIIb+ve (mediana de 852 y 189 días, respectivamente). La figura 10c muestra las diferencias en supervivencia en los subconjuntos FcγRIIb + y -. Los grupos fueron comparables en términos de características clínicas (índice de pronóstico internacional de MCL, no se muestran datos), pero hubo heterogeneidad en tipos de quimioterapia usados. Con el fin de abordar esto, examinamos los resultados en aquellos pacientes tratados con cualquiera de un agente único rituximab o fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) para terapia inicial, y fueron observados resultados similares. La figura 10d muestra las diferencias en supervivencia en los subconjuntos de FcγRIIb + y -después que los grupos de pacientes siguieron siendo controlados, tal como se discutió.

Figura 11. Confirmación de especificidad de mAb anti-FcγRIIb usados en inmunohistoquímica

Las células de Ramos transfectadas por FcγRIIa y FcγRIIb fueron cito-giradas incrustadas en parafina. La inmunohistoquímica que usa mAb para FcγRIIb humano demostró un fuerte teñido de membrana en Ramos transfectadas por FcγRIIb pero no un teñido en células transfectadas por FcγRIIa.

Figura 12. Clones específicos de CD32B inhiben internalización de rituximab

Capacidad de mAb anti-CD32b para bloquear la modulación de rituximab. El eje Y axis muestra CD20 accesible en la superficie (%). Rituximab-alexa 488 fue adicionado a o células de Ramos transfectadas con CD32B en presencia o ausencia de diferente mAb que bloquea CD32b (WT o mutantes 297Q (nq)) y modulación evaluada después de 1, 2, 6 y 24h. Como un control de la capacidad de bloqueo de mAb de CD32 también incluimos el mAb de CD32 a y b específico dual, AT10 (fragmentos de IgG y Fab2 (Fab)), junto con un control negativo; el isotipo coincidió con mAb

irrelevante (iso wt o nq). Finalmente, B1 etiquetado con ALEXa 488 fue incluido como un mAb de control que no modula rápidamente. Los datos claramente indican que todos los 3 mAb de nCoDeR© (C1, C11 y C13) son capaces de bloquear la modulación de rituximab cualquiera de los formatos wt o 297q. En particular el mAb C11 fue extremadamente efectivo.

5 **Figura 13.** Capacidad de mAb anti-CD32b para bloquear la modulación de rituximab. Todos los 13 mAb (nq) y C11 como un wt Rituximab-alexa 488 fueron adicionados en células de Ramos, transfectadas con CD32B en presencia o ausencia de diferentes mAb que bloquean CD32b (mutantes de WT o 297Q) y modulación evaluada después de 1, 2, 6 y 24h. El eje Y muestra CD20 accesible en superficie (%). Como un control para la capacidad de bloqueo de mAb de CD32 también incluimos mAb específicos de CD32a y b duales, AT10 (fragmentos de IgG y Fab2 (Fab)),
10 junto con un control negativo; el isotipo coincidió con mAb irrelevante (iso wt o nq). Finalmente, fue incluido B1 etiquetado con ALEXa 488 como un mAb de control que no modula rápidamente. Adicionalmente, las células de Ramos CD32 negativas de control fueron incluidas para permitir la estimación del efecto máximo del mAb que bloquea CD32. Los datos indican claramente que toda la mayoría de mAb nCoDeR© eran capaces de bloquear la modulación de rituximab. En particular, los mAb C10 y C11 fueron extremadamente efectivos y emparejados para
15 bloquear la modulación casi completamente incluso a las 24 horas.

Figura 14A. Correlación entre afinidad y la capacidad de mAb que bloquea ant-CD32b) la fosforilación de CD32b después de enlace de rituximab.

La afinidad relativa del mAb fue determinada mediante un experimento de titulación de dosis que mide el enlace de mAb a células de CHO transfectadas con CD32B. Brevemente, las células K1 de CHO transfectadas con CD32B
20 fueron sembradas en placas de FMAT. Fueron tituladas IgG en diluciones de 1:2 desde 30nM hasta aproximadamente 0,015nM y se dejaron para que enlazaran durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar se detectaron IgG enlazados con anti-humano-IgG-APC. Finalmente, las placas fueron lavadas y leídas en el FMAT (Applied Biosystems). Esto dio un valor de EC50 para enlace de mAb a células diana de expresión y puede traducirse a una afinidad relativa. Esta afinidad relativa fue correlacionada luego con la capacidad de mAb de bloqueo de anti-CD32b para impedir la fosforilación de CD32b después del enlace de rituximab. Esto fue
25 determinado mediante células estimulantes con rituximab en presencia o ausencia de mAb anti-CD32b y desarrollando luego transferencia Western para fosfo-CD32b. Los mAb de CD32b fueron clasificados de acuerdo con su capacidad para bloquear la fosforilación de CD32, donde 1 era el más efectivo. Hubo evidentemente una correlación cercana entre la afinidad del mAb y la capacidad de bloquear la fosforilación de CD32b.

30 **Figura 14B.** Correlación entre afinidad y capacidad de mAb que bloquea anti-CD32b para impedir la modulación de rituximab.

La correlación entre afinidad del mAb que bloquea ant-CD32b y la capacidad para impedir la modulación de rituximab. La afinidad relativa del mAb fue determinada mediante un experimento de titulación de dosis que mide el enlace de mAb a células de CHO transfectadas por CD32B. Brevemente, las células de CHO K1 adherentes,
35 transfectadas por CD32B fueron sembradas en placas de FMAT. Fueron titulados IgG en diluciones de 1:2 desde 30nM a aproximadamente 0,015nM y dejados para enlazarse durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar IgG enlazado, fueron detectados con anti-humano-IgG-APC. Finalmente, las placas fueron lavadas y leídas en el FMAT (Applied Biosystems). Esto dio un valor de EC50 para enlace de mAb a células de expresión diana y pudo traducirse a una afinidad relativa. Esta afinidad relativa fue correlacionada luego con la capacidad de bloqueo de ant-CD32b para impedir la modulación de rituximab sobre células de Ramos transfectadas por CD32b (mostradas en la figura previa). Hubo evidentemente una fuerte correlación entre la afinidad del mAb y la capacidad para bloquear modulación de rituximab. Estos datos confirman el papel central de CD32B al acelerar la modulación de rituximab desde la superficie de la célula diana.
40

45 **Figura 15.** Según como es mediado por el clon 1. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis y la inhibición del complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis del complejo inmune a células CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 1. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Fueron preparados complejos inmunes recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo hIgG1 FITC-específico. La intensidad total refleja el enlace; mientras más alta sea la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de un complejo inmune (IC) o de mAb.
50

Figura 16. Según como es mediado por el clon 2. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B e enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

55 Los círculos muestran enlace dependiendo de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 2. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes

Figura 23. Según como es mediado por el clon 9. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

5 Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 9. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 molar ratio con un anticuerpo hIgG1 FITC específico. La intensidad total refleja enlace, mientras más alta la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de un complejo inmune (IC) o de mAb.

10 **Figura 24.** Según como es mediado por el clon 10. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

15 Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 10. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo hIgG1 FITC específico. La intensidad total refleja enlace, mientras más alta la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de complejo inmune (IC) o de mAb.

20 **Figura 25.** Según como es mediado por el clon 11. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

25 Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 11. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo hIgG1 FITC específico. La intensidad total refleja enlace, mientras más alta la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de complejo inmune (IC) o de mAb.

Figura 26. Según como es mediado por el clon 12. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

30 Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 12. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo hIgG1 FITC específico. La intensidad total refleja enlace, mientras más alta la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de complejo inmune (IC) o de mAb.

Figura 27. Según como es mediado por el clon 13. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

40 Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis de complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Según como es mediado por el clon 13. Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y después mezclando esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo hIgG1 FITC específico. La intensidad total refleja enlace, mientras más alta la intensidad, más alto el enlace. El enlace es cualquiera de complejo inmune (IC) o de mAb.

Figura 28. Muestra especificidad celular de los anticuerpos anti-CD32B.

PBMCs aisladas de sangre periférica fueron preparadas usando gradiente de densidad de Ficoll. Las células fueron teñidas con marcadores específicos celulares y evaluadas para enlace de los anticuerpos específicos de CD32B. Tal como se muestra en la figura, solamente células B (CD 19+ células) fueron teñidas positivas con clon 1-13.

50 **Figura 29.** Teñido dependiente de dosis de B células por el clon 1-13.

PBMCs aisladas de sangre periférica fueron preparadas usando gradiente de densidad de Ficoll. Las células fueron teñidas con CD 19 y después con 10, 1 o 0,1 mg/ml de anticuerpos CD32B específicos, tal como se indica. En esta figura, han sido descartadas células B (conocidas por expresar CD32B) usando un mAb CD19. Esta salida se llama

"M1". Cuando se disminuye la concentración de mAb de CD32B, la cantidad de células B teñidas cae desde cerca del 100 % a valores mucho más bajos, lo cual muestra un teñido de células B específico y dependiente de dosis, según se espera de un mAb CD32B específico.

Figura 30. Capacidad de cada mAb para inhibir fosforilación de CD32B mediada por Fc.

- 5 Las células de Raji (CD32B positivas) fueron tratadas con Rituximab (Rit), lo cual causó la fosforilación de CD32B. Esto fue hecho en ausencia o en presencia de mAb específico de CD32B, 1-13, y la figura demuestra cada capacidad de mAb de inhibir fosforilación de CD32B mediada por Fc. "TUB" = control de tubulina.

Figura 31. El efecto de CD32b en la velocidad de modulación de mAb anti-CD20 de tipo I.

- 10 La capacidad de CD32b de precipitar la internalización de otro mAb anti-CD20 de tipo I. Versiones etiquetadas con Alexa-488 de cada mAb fueron incubadas con células de Ramos transfectadas por pCDNA3 o células de Ramos transfectadas por CD32B por 1 o 6 hr y el alcance de la modulación fue determinada como antes. Los mAbs usados fueron rituximab (RTX), ofatumumab producido en las propias instalaciones (OFA) y tositumomab (Tos). Los datos muestran claramente que la velocidad de internalización de OFA es similar a la de RTX y se acelera por la presencia de CD32b.

- 15 **Figura 32.** mAb anti-CD19 también se internaliza desde la superficie celular de células B humanas maligno de una manera que es parcialmente dependiente de CD32B.

- 20 Transfectantes huCD32b de Ramos. La internalización con otros antígenos de superficie también puede efectuarse mediante expresión de CD32b. El ensayo de modulación fue realizado como antes, con diferente mAb en presencia (+) o ausencia (-) de bloqueo de CD32 con AT10. Fueron usados transfectantes de CD32B de Ramos en este 6° ensayo. * $p < 0,05$. f3.3 = MHC Clase II; RFB9 = CD 19; RTX = rituximab. Si el mAb permanece en la superficie de la célula, puede extinguirse. Si se internaliza, no puede distinguirse. Mientras más bajo el % de extinción, más alto es el nivel de internalización. Los datos muestran claramente una reducción significativa en la modulación superficial para mAb de RTX y RFB9, y menos de una reducción para mAb de F3.3, después de incubación con bloqueo de CD32. Estos datos indican que los antígenos diana tales como CD 19 también pueden internalizarse desde la superficie celular de células B humanas malignas de una manera que es parcialmente dependiente de CD32B y puede bloquearse por parte de mAb anti-CD32b.

- 25 **Figura 33.** La internalización con otros antígenos de superficie también puede efectuarse mediante expresión de CD32b. Las versiones etiquetadas con Alexa-488 de cada mAb fueron incubadas con células de Ramos transfectadas por pCDNA3 o células de Ramos transfectadas CD32B por 24h y el alcance de la modulación fue determinado como antes. * = $p < 0,05$. El eje y muestra modulación/internalización o antígeno accesible en superficie (%). La figura muestra esto porque la cantidad de internalización/modulación se incrementa en la presencia de huCD32b. Nótese que tanto para mAb anti-CD19 como para mAb anti-CD40 a un decrecimiento estadísticamente significativo (*, $p < 0,05$) en el antígeno de superficie celular en presencia de CD32b.

- 30 **Figura 34.** Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de los 14 clones de anticuerpo dirigido contra CD32B humano en el formato de IgG1- λ . Se muestran secuencias de aminoácidos de las regiones de IgG1-CH y λ -CL.

Figura 35. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables del clon 1 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

- 35 Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias de CDR etiquetadas se indican como secuencias en una caja, separadas por las regiones de marco etiquetadas.

Figura 36. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables del clon 2 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

- 40 **Figura 37.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables del clon 3 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

- 45 **Figura 38.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 4 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

- 50

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

Figura 39. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 5 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

5 Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL regions. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

Figura 40. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 6 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

10 Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

Figura 41. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 7 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

15 **Figura 42.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 8 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

20 **Figura 43.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 9 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano.

Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

25 **Figura 44.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 10 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano. Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

Figura 45. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 11 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano. Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

30 **Figura 46.** Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 12 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano. Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

Figura 47. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de clon 13 de anticuerpo dirigido contra CD32B humano. Se muestran secuencias de aminoácidos para las regiones de VH y VL. Las secuencias en una caja representan las secuencias de CDR.

35 **Ejemplo 1:** Modulación de CD20 en muestras primarias de CLL y de otras NHL

Previamente observamos heterogeneidad en la velocidad y alcance de modulación de rituximab en un grupo de muestras de CLL (28). Para validar y extender estos hallazgos hemos incrementado este grupo a un total de 48 muestras de CLL (Figura 1A). Igual que antes, comparamos la capacidad de rituximab y tositumomab (prototipos clínicamente relevantes de mAb de tipo I y II, respectivamente) para reducir la cantidad de CD20 accesible en la superficie después de 2, 6 y 24 h (Fig 1A y no se muestran datos). Además, también ensayamos ofatumumab generado en instalaciones propias) (ofatum; tipo I) el cual ha sido aprobado recientemente por FDA para su uso en CLL con relapso, y una versión no glicomodificada de GA101 (GA101gly; tipo II) que se encuentra actualmente en desarrollo clínico para una gama de NHL (19). En línea con nuestras observaciones previas, hubo una heterogeneidad considerable entre las muestras, pero el mAb de tipo I dio lugar significativamente mayor que el mAb de tipo II. A las 6 horas, la modulación en presencia de rituximab estuvo cerca del máximo, entre 18 y 65 % (mediana de 37 %) del mAb que permanecía accesible en el ensayo de extinción (Figura 1A). De modo consistente con su naturaleza de tipo I, ofatumumab también dio lugar a un alto grado de modulación (mediana de 26 % accesible a las 6 h). En contraste, tositumomab y GA101gly mostraron mucho menos modulación, con una mediana de 80 % (intervalo de 61 - 89 %) y 70 % (intervalo de 57-81 %) de mAb enlazado, accesible a las 6 horas, respectivamente.

Dentro del grupo de CLL, examinamos un número de factores conocidos por ser importantes en el diagnóstico de CLL, lo que incluye expresión de ZAP-70 (29, 30), positividad de CD38 (31, 32) y estado de mutación de genes IgVH (31, 33, 34). Los resultados (figura complementaria 1A) no mostraron correlación con ninguno de estos marcadores de la enfermedad.

5 Previamente demostramos que a pesar de que cada subtipo de NHL tiene un patrón distinto de modulación, también mostraron modulación considerable de heterogeneidad de CD20 (28). Para explorar esto aún más, extendimos la cantidad de muestras primarias analizadas para que incluyeran 8 voluntarios sanos, 7 SLL, 7 MCL, 11 FL y 7 DLBCL (Figura 1B). La diferencia en la capacidad de mAb de tipo I y II para inducir modulación persistió a través de todos los sub-tipos histológicos. También observamos que CD20 en células B de los voluntarios sanos modularon rápidamente en presencia de rituximab, y también de modo más uniforme que con las células B malignas, lo que sugirió que los factores asociados con la malignidad contribuyen a la heterogeneidad observada. La velocidad de modulación inducida por rituximab con células de SLL y MCL fue similar a aquella con CLL (Figura 1A), mientras que para DLBCL y FL la velocidad fue un poco más lenta ($p < 0,0001$ y $0,0027$ respectivamente, al compararse con CLL de la figura 1A). Sin embargo, en FL sí observamos que 2/11 muestras de pacientes modularon rituximab muy rápidamente, lo que dejó niveles apenas detectables de mAb o CD20 después de 6 h de cultivo.

Ejemplo 2: Modulación de CD20 en B-NHL es un procedimiento dependiente de Fc.

Nosotros y otros hemos mostrado previamente que la eficacia de mAb anti-CD20 in vivo es dependiente de Fc (28). Hemos hecho la hipótesis de que la modulación, incluso en ausencia de células efectoras también puede ser dependiente de Fc y probamos esto repitiendo el ensayo de internalización con fragmentos de Fab' y F(ab')₂ de rituximab (Figura 2A). Fab' de rituximab mostró solamente un nivel bajo de modulación que podría explicarse por la necesidad de entrecruzamiento bivalente de CD20 o por su baja afinidad a enlace univalente, según se confirma mediante ensayos de enlace celular (los datos no se muestran). En contraste, F(ab')₂ y IgG mostraron un perfil de enlace similar (no se muestran resultados), pero después de 6 horas de cultivo, el fragmento de F(ab')₂ se había modulado significativamente menos (40 % de CD20 accesible en la superficie) que el IgG intacto (20 % CD20 accesible en la superficie). Puesto que los ensayos se realizaron con células B altamente enriquecidas (puras > 95 %), el único FcR presente en abundancia sería el FcγRIIb inhibitorio. En presencia de un mAb anti-FcγRII de bloqueo, AT10, la modulación con rituximab fue reducida y comparable con fragmentos de F(ab')₂ de rituximab o Rit m2a, que se enlazan a FcγRIIb con una afinidad más baja que rituximab que IgG1 humano (Figura 2B). Como se esperaba, la co-incubación con AT10 dio lugar a una influencia muy baja en la modulación de Rit m2a.

30 **Ejemplo 3:** Expresión de FcγRIIb en células B normales y tumores de células B

Dada la posibilidad de que las interacciones de FcγRIIb:Fc pudieran afectar la velocidad de modulación de CD20, examinamos la expresión de FcγRIIb en células B normales y nuestro panel de tumores de células B primarias. Tal como se muestra en la figura 2C, hubo una marcada heterogeneidad de expresión de FcγRIIb dentro de cada grupo. La expresión en células de CLL fue relativamente alta, en un intervalo de 20 a 300 veces sobre el control de isotipo. DLBCL y la mayor parte de FL mostró una baja expresión de FcγRIIb. Dos casos de FL mostraron una expresión muy alta de FcγRIIb, y de modo impresionante, estos fueron los mismos dos casos que habíamos observado previamente que modulaban de modo extremadamente rápido. MCL y SLL expresaron un nivel intermedio aunque heterogéneo de FcγRIIb (Figura 2C), nuevamente consistente con hallazgos previos (21).

Ejemplo 4: Expresión de FcγRIIb regula la modulación de CD20

40 En total, estos hallazgos sugirieron que la expresión de FcγRIIb puede ser un gran determinante de la modulación de CD20 a partir de células B diana. Para ensayar esta hipótesis, comparamos la expresión de FcγRIIb y la modulación de velocidades de CD20 de todas nuestras muestras disponibles de células B sanas y NHL primarias (Figura 2D). El análisis de correlación de Spearman reveló una fuerte relación entre estos parámetros (valor r de Spearman -0,74, con intervalos de confianza a 95 % entre -0,83 y -0,61 y $p < 0,0001$). Los datos mostraron una curva exponencial inversa con la mayoría de casos de FL y DLBCL posicionados en la parte superior con muestras de CLL y MCL que mostraban una distribución extendida. Este gráfico también demuestra que a niveles de expresión bajos las pequeñas diferencias en la expresión de FcγRIIb podrían ser responsables de cambios relativamente grandes en la modulación de CD20, por lo cual se enfatiza la capacidad de este receptor para regular la cuota de complejos anti-CD20:CD20 desde la superficie de la célula.

50 Para abordar directamente el papel de FcγRIIb en la modulación de CD20, fueron transfectadas células de Ramos de FcγRIIb^{-ve} con un plásmido que codifica FcγRIIb. Las células resultantes de FcγRIIb^{+ve} mostraron una expresión variable de niveles de FcγRIIb y a continuación fueron clasificadas en sub- clones que expresan bajo, medio y alto FcγRIIb. Estas células, junto con células de Ramos de FcγRIIb paternas fueron evaluadas luego en el ensayo de internalización. En la presencia de rituximab, la modulación de CD20 clasifica a 6 horas correlacionada con la expresión de FcγRIIb con modulación creciente en el orden FcγRIIb^{-ve} > bajo FcγRIIb^{+ve} > FcγRIIb^{+ve} medio > FcγRIIb^{+ve} alto (Figura 3A). De manera similar, usando células B obtenidas del tipo silvestre y ratones no-caut (KO) de FcγRII que expresan CD20 humano transgénico, la modulación en células de ratón FcγRIIb^{-/-} fue menos que la contraparte de tipo silvestre (no se muestran datos), aunque debió notarse que la modulación apreciable todavía se

observaba en ausencia de FcγRII, lo que indica que en este modelo transgénico también se involucran factores adicionales a FcγRII para regular la modulación de CD20.

Puesto que FcγRIIb es un regulador negativo de activación de BCR en células B (revisado en (35)) y CD20 se asocia físicamente con el BCR después de involucrarse por parte del mAb de CD20 (36, 37), hicimos la hipótesis de que la expresión de BCR o la actividad de señalización podría influir la modulación. Por lo tanto, para excluir diferencias en la expresión de BCR, como la causa de estos hallazgos, fueron transfectadas células de Ramos (Rx3) deficientes en BCR con FcγRIIb, y la modulación de CD20 fue comparada con células de Ramos no manipuladas y células transfectadas Rx3 por imitación (Figura 3B). Estos datos indican claramente que las células Rx3 que carecen de expresión de BCR se modulan más lentamente que las células de Ramos pero que este defecto puede superarse expresando altos niveles de FcγRIIb (células de Rx3 FcγRIIb+ve). Este rol dominante de FcγRIIb sobre BCR en la regulación de la modulación de CD20 es soportado por lo siguiente: 1) que observamos altos niveles de modulación en células de CLL que expresan de modo característico bajos niveles de BCR (38); y 2) no pudimos mostrar ninguna correlación entre expresión de inmunoglobulina de superficie (slg) en células de CLL y modulación de CD20 (figura complementaria 1C).

Ejemplo 5: Modulación de CD20 y FcγRIIb es precedida por la activación de FcγRIIb

Para investigar adicionalmente la interacción entre mAb anti-CD20 y FcγRIIb, investigamos la estimulación mediada por anticuerpo de FcγRIIb, tal como se indica mediante fosforilación de tirosina-293 en el motivo ITIM intracelular. Fueron cultivadas células de Raji con tositumomab o rituximab en presencia o ausencia de mAb que bloquea anti-FcγRIIb (AT10), antes de inmunoblot para FcγRIIb fosforilado. FcγRIIb fosforilado fue elevado en células estimuladas por rituximab, pero no por tositumomab, y fue inhibido por la adición de AT10 (Figura 4A). Se observaron resultados similares con células de Daudi (no se muestran datos).

Ejemplo 6: Entrecruzamiento de CD20 y FcγRIIb ocurre de manera predominante de una manera cis

Rituximab pudo co-ligarse por CD20 y FcγRIIb en las mismas (cis) células o en células adyacentes (trans). Para investigar esto cultivamos conjuntamente células de Ramos de FcγRIIb etiquetadas con PKH26 con transfectantes de Ramos que expresan FcγRIIb alto (Figura 4B), y luego se compara el nivel de modulación en cada tipo de células, con ambos tipos de células cultivados solos en calidad de control. Como se mostró previamente, cuando se cultivan solas las células de FcγRIIb^{+ve} se mostró una modulación más grande que las células que carecen de FcγRIIb (Figura 4B). En el cultivo conjunto, el nivel de modulación en FcγRIIb^{-ve} fue ligeramente incrementado pero no alcanzó el nivel visto en las células de FcγRIIb^{+ve}. Este resultado sugiere que mientras puede ocurrir una interacción trans, la modulación de mAb de CD20 por FcγRIIb es conducida de manera predominante de una manera cis.

Para demostrar que este hallazgo no fue específico para la línea celular de Ramos, cultivamos conjuntamente una muestra de CLL que expresaba bajo FcγRIIb (distinguido por etiquetado de PKH26) con células de tres diferentes casos de CLL que expresan niveles altos de FcγRIIb (Figura 4C). Tal como se ve en el ensayo anterior con células de Ramos, en las poblaciones mixtas la modulación en las células B de FcγRIIb bajo no se aproximaba a la vista en la población de FcγRIIb alto, lo que sugirió nuevamente que la modulación de mAb de CD20 por FcγRIIb es conducida de manera predominante de una manera cis. Sin embargo, es interesante anotar que el cultivo conjunto con las células de CLL que modulaban de la manera más rápida dio lugar a incremento más grande en la modulación de la CLL que expresa FcγRIIb bajo, pero el incremento fue solamente modesto (aproximadamente 18 %; no se muestran datos).

En un experimento adicional de este tipo, se cultivaron células de CLL a concentraciones decrecientes para reducir el potencial para interacción de célula:célula, con el resultado de una tendencia débil de menos modulación con concentración decreciente de células (Figura 4D). El mismo experimento fue repetido con diferentes concentraciones de células Raji y nuevamente se vio poco cambio en el grado o el alcance de modulación (no se muestran datos). De manera importante, las imágenes microscópicas de campo claro tomadas durante este experimento demuestran que la probabilidad de interacción intercelular (trans) fue mucho menos de 1×10^5 en comparación con 2×10^6 células/ml. Además, observamos que no hubo una diferencia marcada en los niveles de FcγRIIb fosforilado a las diferentes densidades celulares (Figura 4E). En total, estos datos indican que FcγRIIb media sus efectos sobre la modulación de mAb de CD20 de manera predominante a través de eventos en la misma célula solamente con una pequeña contribución de las células adyacentes que expresan FcγRIIb.

Ejemplo 7: FcγRIIb es endocitosado con CD20 en lisosomas

Para determinar el destino de FcγRIIb después de involucrarse rituximab en la superficie celular, monitoreamos su expresión y localización mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Usando citometría de flujo evaluamos la expresión superficial de FcγRIIb en células B a partir de seis casos diferentes de CLL y se encontró que disminuía dentro de 2 horas de incubación con rituximab pero no con tositumomab (Figura 5A). Estos hallazgos sugieren que FcγRIIb puede internalizarse junto con CD20 y rituximab (pero no con tositumomab) como parte de un complejo de tres partes.

Nosotros y otros hemos previamente reportado endocitosis de rituximab lo que da lugar a su tráfico a endosomas tempranos y degradación subsiguiente en lisosomas (9, 28). Para abordar si el mismo procedimiento ocurrió con FcγRIIb como parte de un complejo anti-CD20:CD20:FcγRIIb en células de CLL las cultivamos con cualquiera de Tosit-488 o Ritux-488 antes de fijar y teñir para FcγRIIb (usando F(ab')₂, etiquetado con Alexa 647, de AT10) y el marcador lisosómico LAMP-1. Antes de la estimulación con mAb, el teñido de FcγRIIb era difuso y no localizado en la membrana de plasma (Figura 5B). Siguiendo a la incubación con mAb anti-CD20 por 30 minutos, observamos una diferencia nítida en el teñido entre Ritux-488 y Tosit-488, por lo cual Tosit-488 permaneció exclusivamente en la superficie y Ritux-488 demostró un teñido intracelular punteado, consistente con nuestras observaciones previas (Figura 5C, no se muestran datos y (28)). Después de 6 horas de estimulación, Tosit-488 permaneció uniformemente distribuido a través de la superficie celular, mientras que AT 10-647 no fue modificado desde su apariencia de línea de base a 30 min, y no hubo co-localización con LAMP-1 (Figura 5D). En contraste, al terminarse el mismo transcurso de tiempo, Ritux-488 mostró un patrón punteado nítido con la mayoría de las células (58 %) lo cual demostró una co-localización entre AT10-647 y Ritux-488 (Figura 5E). También fue observada una co-localización de Ritux-488 tanto con LAMP1 como también con AT10-647 en 33 % de las células. Presuntamente, el grado más bajo de co-localización observado entre todas las tres tinturas refleja el hecho de que Ritux-488 y FcγRIIb se internalizan juntas y ocupan probablemente otros compartimientos intracelulares antes de su aparición en lisosomas.

Ejemplo 8: FcγRIIb inhibe mAb anti-CD20 de tipo I in vivo

Para abordar si FcγRIIb puede inhibir la eficacia de mAb anti-CD20 de tipo I in vivo, desarrollamos experimentos de agotamiento de células B en ratones de tipo silvestre Tg de hCD20 y también en ratones Tg de hCD20 que carecen de FcγRIIb (CD32 KO). En estos experimentos los ratones fueron tratados con variantes de rituximab (250 µg, iv) que albergaban IgG1 de ratón (m1) o IgG2a de ratón (m2a) y luego fue monitoreado el agotamiento de células B mediante citometría de flujo durante 90 días por medio de sangrado en serie de los ratones y teñido con mAb de B220 y CD19 (Figura 6). Estas variantes se enlazan fuertemente (m1) o débilmente (m2a) a CD32b. Los datos muestran claramente que cuando fue usado el isotipo m1, el agotamiento es sub-óptimo (en comparación con el m2a) y que la pérdida de CD32 da lugar a un mejoramiento sustancial en eficacia de agotamiento. En contraste, el m2a es en gran medida similar en presencia o ausencia de CD32.

Ejemplo 9: FcγRIIb mejora y aumenta la actividad de mAb anti-CD20 contra tumores humanos in vivo

Para examinar el efecto de CD32 en células tumorales humanas y el potencial de aumentar los mAbs terapéuticos actuales, tales como rituximab, empleamos un sistema de xenoinjerto. En este sistema solamente las células tumorales humanas expresan hCD32 y de esta manera cualquier efecto terapéutico se deriva de los efectos sobre la célula tumoral, de la manera más probable mediante bloqueo de modulación, no mediante efectos cualesquiera sobre células efectoras hospederas. En estos experimentos, las células tumorales humanas CD32 positivas (Daudi o Raji) fueron inoculadas en ratones SCID y luego tratadas con rituximab, con AT10 o con ambos y la supervivencia de los ratones o el crecimiento del tumor fueron monitoreados (Figura 7). Las dosis usadas de mAb se muestran en las leyendas de la figura. En A) las células de Daudi fueron inoculadas de modo subcutáneo y el tumor fue monitoreado mediante mediciones de calibre cada 3-5 días. En las células tumorales de Raji B y C fueron inyectados de modo intravenoso y se monitorearon los animales para supervivencia. En ambos modelos se mostró que AT10 mejoraba y aumentaba la actividad de rituximab, lo que demostró el potencial de esta combinación in vivo.

Ejemplo 10: Niveles de FcγRIIb predicen resultado clínico en pacientes con MCL tratados con rituximab.

Como prueba conceptual de nuestros hallazgos in vitro, examinamos retrospectivamente la expresión de FcγRIIb de un grupo de MCL que había recibido rituximab. El tejido incrustado en parafina para diagnóstico fue teñido mediante inmunohistoquímica usando un mAb FcγRIIb-específico (Figura 11). El teñido de membrana fuerte fue visto en muestras de linfoma de FcγRIIb+ve pero no en FcγRIIb-ve. Estos resultados se correlacionan con la expresión de FcγRIIb de muestras correspondientes congeladas en DMSO, obtenidos mediante citometría de flujo. El teñido de FcγRIIb mostrado en la figura 10a y b mediante IHC fue correlacionado con la expresión de FcγRIIb mostrada mediante citometría de flujo tal como se muestra en la figura 2D (con el valor determinado mediante citometría de flujo en 2D mostrado como la cantidad insertada en la figura 10a y b). A pesar de estudiar sólo un pequeño grupo de 16 pacientes con MCL, los pacientes con linfoma FcγRIIb-ve tuvieron supervivencia libre de progreso mediano significativamente mejor que aquellos con células de FcγRIIb+ve (mediana de 852 y 189 días, respectivamente). La figura 10c muestra las diferencias en supervivencia en los subconjuntos de FcγRIIb + y -. Los grupos fueron comparables en términos de características clínicas (índice de pronóstico internacional MCL, no se muestran datos), pero hubo heterogeneidad en los ciclos de quimioterapia usados. Para abordar esto, examinamos los resultados en aquellos pacientes tratados con agente único rituximab o fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) para terapia inicial, y se observaron resultados similares. La figura 10d muestra las diferencias en supervivencia en los subconjuntos FcγRIIb + y - después que los grupos de pacientes siguieron controlándose tal como se ha discutido.

El razonamiento para los experimentos en los ejemplos 10 y 11 es tal como sigue. Si las células expresan altos niveles de CD32b (FcγRIIb), ellas internalizarán rituximab más rápidamente (se muestra como % reducido de CD20 accesible en la superficie). Si hay menos rituximab en la superficie de la célula, entonces habrá menos actividad efectora dependiente de Fc (tal como fagocitosis o ADCC) y, por lo tanto, menos eliminación de células tumorales y

por ende menos resultados terapéuticos extensos. Por lo tanto, chequeamos la expresión de FcγRIIb en un grupo de pacientes tratados con MCL y se determinó si eran agentes de expresión altos o bajos de CD32b. Para este grupo ya estaban disponibles los datos clínicos y de esta manera los resultados clínicos fueron estratificados luego según si eran tumores que expresaban FcγRIIb alto o bajo. La hipótesis fue que los tumores que expresaban bajos niveles de FcγRIIb serían tratados exitosamente con rituximab y aquellos que expresaban altos niveles de FcγRIIb lo harían menos bien. Esto es exactamente lo que se muestran los datos clínicos. La figura 11 muestra la especificidad del mAb usado para el tinte de FcγRIIb. Este tinte solamente células que expresan FcγRIIb NO el FcγRIIa íntimamente relacionado.

Después de medir niveles de FcγRIIb por medio de IHC (Figura 10b) y separar muestras de MCL en positiva y negativa para FcγRIIb, vimos una diferencia clínica clara en respuesta siguiente a la terapia a base de rituximab (figuras 10c y d).

Ejemplo 11 -Selección de anticuerpos monoclonales anti-CD32b

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables (VH y VL), junto con las regiones CDR de los 14 clones de anticuerpos se muestran en las figuras 37 - 50. En cada caso, las regiones constantes (CH y CL) son las mismas. Las regiones constantes se muestran en la figura 36.

Se realizaron selecciones contra CD32B (FcγRIIb) usando la biblioteca exhibidora de fagos n-CoDeR@scFv. Fue usado CD32A no humano como no diana. Los dominios extracelulares de CD32A y CD32B fusionados en mIgG3-Fc fueron producidos en HEK293E y purificados sobre proteína A. se realizaron tres elecciones consecutivas de proteína. Fue usada una no diana como competidor en todas las selecciones. Los fagos resultantes fueron convertidos en formato que produce scFv/Fab y se transforma en bacterias E.coli Top10 para el tamizaje de clones individuales. El tamizaje determinó la especificidad para CD32B humano y CD32A fue analizado usando proteínas recubiertas en ELISA así como también mediante células CHO transfectadas en FMAT. Para determinación de propiedades de inhibición de IC, se dejaron enlazar los IgGs a células CHO transfectadas por CD32B seguido por la adición de un IC en forma de IgG1 recubierto con albúmina de suero bovino. Luego fue detectado IC enlazado y pudieron evaluarse propiedades de inhibición de los IgGs.

Ejemplo 12 - Capacidad de mAb anti-CD32b de bloquear la modulación de rituximab

Rituximab-alexa 488 se adicionó a células de Ramos transfectadas CD32B en presencia o ausencia de diferentes mAb (mutantes de WT o 297Q) que bloquean CD32b y se evaluó la modulación después de 1, 2, 6 y 24 h. En calidad de control para la capacidad de bloqueo de MAb de CD32 también incluimos el mAb específico de CD32a y b dual, AT10 (IgG y fragmentos de Fab2 (Fab)), junto con un control negativo, mAb irrelevante emparejado con isótopo (iso wt o nq). Los datos en la figura 12 indican claramente que todos los 3 mAb de nCoder (C1, C3 y C11) son capaces de bloquear la modulación de rituximab en cualquiera de los formatos wt o 297q.

La figura 13 muestra la capacidad de mAb anti-CD32b para bloquear modulación de rituximab usando todos los 13 mAb. Además, las células de Ramos negativas de CD32 de control fueron incluidas para permitir la estimación del efecto máximo del mAb que bloquea CD32. Los datos en la figura 12 indican claramente que todos los mAb de nCoder fueron capaces de bloquear la modulación de rituximab.

El conjunto anterior de experimentos habían demostrado que FcγRIIb regula la internalización de rituximab. Por lo tanto, estos experimentos buscaban examinar si el bloqueo de FcγRIIb con mAb anti-FcγRIIb reduciría la cantidad en que rituximab se internaliza.

Ejemplo 13. Correlación entre afinidad y capacidad de mAb que bloquea anti-CD32b para impedir la fosforilación de CD32b después del enlace de rituximab y para impedir la modulación de rituximab

La afinidad relativa del mAb fue determinada mediante un experimento de titulación de dosis que medía el enlace de mAb a células CHO transfectadas por CD32B. Brevemente, las células CHO K1 adherentes transfectadas por CD32B fueron sembradas en placas de FMAT. IgG fueron titulados en diluciones 1:2 a partir de 30nM a aproximadamente 0,015nM y se dejó enlazar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar se detectaron IgG enlazados con anti-humano-IgG-APC. Finalmente se lavaron las placas y se leyeron en el FMAT (Applied Biosystems). Esto da un valor de EC50 para enlace de mAb a células de expresión diana y puede traducirse a una afinidad relativa. La afinidad relativa fue correlacionada luego con la capacidad de mAb de bloqueo de anti-CD32b para impedir la fosforilación de CD32b después del enlace de rituximab. Esta fue determinada estimulando células con rituximab en presencia o ausencia de mAb anti-CD32b y realizando luego transferencia Western para fosfo-CD32b. Los mAb de CD32b fueron clasificados luego según su capacidad de bloquear la fosforilación de CD32, y en este caso 1 es la más efectiva. La figura 14A muestra que hubo evidentemente una correlación cercana entre la afinidad del mAb y la capacidad de bloquear la fosforilación de CD32b. La figura 14B muestra que hubo evidentemente una correlación fuerte entre la afinidad del mAb y la capacidad de bloquear la modulación de rituximab. Estos datos confirman el papel central de CD32B en acelerar la modulación de rituximab desde la superficie de la célula diana.

La razón fue que la afinidad más alta de mAb bloquearía mejor FcγRIIb. A continuación, mientras mejor sea bloqueado FcγRIIb por mAb, mejor se bloquearán la modulación/ la internalización de rituximab. Esto es exactamente lo que se muestra en la figura 14. Mientras mayor sea la afinidad, mejor habrá bloqueado la activación de FcγRIIb (medida por la cantidad de tinte de fosfo-FcγRIIb mediante transferencia Western) inducida por el enlace de rituximab y también mejor habrá bloqueado la modulación.

Ejemplo 14. Enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B.

Las células fueron sembradas en placas de FMAT. Los complejos inmunes fueron preparados recubriendo FITC sobre BSA y mezclando después esto con una proporción molar de 10:1 con un anticuerpo IgG1 FITC específico. Las figuras 15-27 muestran el enlace dependiente de dosis a células transfectadas por hCD32B y el enlace dependiente de dosis e inhibición de complejo inmune a células transfectadas por hCD32B mediados por clones 1-13, respectivamente. Los círculos muestran enlace dependiente de dosis a células de CHO K1 transfectadas por hCD32A y los diamantes negros muestran enlace dependiente a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B. Las cruces muestran inhibición dependiente de dosis del complejo inmune a células de CHO K1 transfectadas por hCD32B.

Los experimentos se diseñan para 1) determinar la especificidad de del mAb. CD32B y CD32A son moléculas muy cercanamente relacionadas. Sin embargo, mientras que CD32B transmite una señal inhibitoria, CD32A transmite una positiva, por ende es esencial que el anticuerpo enlace solamente CD32B para el efecto deseado. 2) además, para bloquear efectivamente una señal a través de CD32B, el anticuerpo no solamente tiene que enlazar CD32B, sino también bloquear el enlace de su ligando natural, un complejo inmune (IC). Por lo tanto, la figura muestra enlace a CD32A, CD32B e inhibición de enlace de IC. Las figuras demuestran que todos los mAb son específicos para CD32B y no se enlazan con CD32A y que todos ellos inhiben enlace de IC.

Ejemplo 15. Especificidad celular de los anticuerpos anti-CD32B.

PBMCs aisladas de sangre periférica fueron preparadas usando gradiente de densidad de Ficoll. Las células fueron teñidas con marcadores específicos celulares y evaluadas para enlace de los anticuerpos específicos de CD32B. Tal como se muestra en la figura 28, solamente las células B (células CD19+) fueron teñidas de modo positivo con los clones 1-13.

En las PBMCs restantes, CD32B se expresa solamente en células B mientras que CD32A estrechamente relacionado se expresa en monocitos y neutrófilos. Las anteriores figuras muestran especificidad en células CHO transfectadas. La figura 28 muestra que los anticuerpos también enlazan células B que expresan CD32B en su forma verdaderamente nativa en células B mientras ellas no tienen neutrófilos o monocitos que expresan CD32A. Por lo tanto, estas figuras una demostración de especificidad de anticuerpo cuando el antígeno se expresa en PBMCs normales no transfectadas.

Ejemplo 16. Teñido dependiente de dosis de células B por clones 1-13 de mAb anti-FcγRIIb.

PBMCs aisladas de sangre periférica fueron preparadas usando gradiente de densidad de Ficoll. Las células fueron teñidas con CD19 y después con 10, 1 o 0,1 mg/ml de anticuerpos específicos de CD32B tal como se ha indicado. La figura 29 muestra como el teñido de las células B por cada uno de los clones es dependiente de la dosis.

En la figura 29, las células B (conocidas por expresar CD32B) han sido descartadas usando un mAb específico de CD19. Esta salida se llama M1. Cuando se disminuye la concentración de mAb de CD32B, la cantidad de células B teñidas cae desde cerca de 100 % a valores mucho más bajos, lo cual muestra un teñido específico y dependiente de dosis de células B, tal como se espera de un mAb específico de CD32B.

Esto es nuevamente una demostración de la especificidad de los anticuerpos. Como ya se mencionó, CD32A y B se relacionan de manera extremadamente cercana y la obtención de anticuerpos específicos no es trivial. Cualquier anticuerpo específico debería mostrar un enlace dependiente de dosis y esto es lo que se demuestra en la figura 29, que disminuir la dosis de anticuerpo reduce la cantidad de células B teñidas desde aproximadamente 100 %, según se observa en la dosis más alta. Por ende, esta figura es una segunda demostración de especificidad de anticuerpo cuando el antígeno se expresa en células B normales no transfectadas.

Ejemplo 17. Capacidad de cada mAb de inhibir fosforilación de CD32B mediada por Fc.

Las células de Raji (CD32B positivas) fueron tratadas con Rituximab, lo cual causó la fosforilación de CD32B. Esto se hizo en ausencia wenn presencia de los mAb 1-13 específicos de CD32B y la figura 30 la capacidad de cada uno de los mAb para inhibir la fosforilación de CD32B mediada por Fc.

La hipótesis detrás de los ejemplos 17 y 18 es que la región de Fc de rituximab enlaza FcγRIIb y que esto causa la activación de FcγRIIb. Esto se mide mediante la fosforilación de la región ITIM del FcγRIIb. El bloqueo de esta

interacción con mAb anti-FcγRIIb debería bloquear la fosforilación (figura 30) y la modulación (figuras 31 y 32). El wt FcγRIIb IgG1 también tiene la capacidad de enlazar el FcγRIIb mediante su región Fc y de esta manera examinamos si el mutante de N297Q (que tiene un Fc que no enlaza FcγRIIb) también tuvo una actividad similar. Este tuvo una actividad idéntica.

5 **Ejemplo 18.** El efecto de CD32b en la velocidad de modulación de mAbs anti-CD20 de tipo I.

La capacidad de CD32b de precipitar la internalización de otros mAbs anti-CD20 de tipo I se muestra en la figura 31. Las versiones etiquetadas con Alexa-488 de cada mAb fueron incubadas con células de Ramos transfectadas por pCDNA3 o células de Ramos transfectadas por CD32B durante 1 o 6 horas y el alcance de la modulación fue determinado tal como antes. Los mAbs usados fueron rituximab (RTX), ofatumumab producido en las instalaciones
10 propias (OFA) y tositumomab (Tos). Los datos muestran claramente que la velocidad de internalización de OFA es similar a la de RTX y se acelera mediante la presencia de CD32b.

Estos efectos de modulación fueron observados con rituximab (un anti-CD20 de tipo I) pero fueron menos evidentes con tositumomab (un mAb anti-CD20 de tipo II). Por lo tanto, quisimos abordar si esto se extendía a otros mAbs anti-CD20 y de esta manera ensayamos ofatumumab, otro mAb de tipo I clínicamente relevante (Teeling, 2004 (52)
15 Ofatumumab, tal como rituximab fue rápidamente internalizado, tal como se esperaba.

Ejemplo 19. mAb anti-CD19 también se internalizan desde la superficie celular de células B humanas malignas de una manera que es parcialmente dependiente de CD32B.

Los transfectantes de Ramos de huCD32b. La internalización con otros antígenos de superficie también puede efectuarse mediante expresión de CD32b. El ensayo de modulación fue realizado como antes, con diferentes mAb
20 en presencia (+) o ausencia (-) de bloqueo de CD32 con AT10. Los transfectantes de Ramos de CD32B fueron usados en este 6° ensayo. * p < 0,05. f3.3 = MHC Clase II; RFBP = CD 19; RTX = rituximab. La figura 32 muestra claramente una reducción significativa en la modulación superficial para mAb RTX y RFB9 y menos para F3.3 después de la incubación con bloqueo de CD32. Estos datos indican que los antígenos diana tales como CD 19 también pueden internalizarse desde la superficie celular de células B humanas malignas de una manera que es
25 parcialmente dependiente de CD32B y puede bloquearse por mAb anti-CD32b.

Quisimos determinar si los antígenos diana distintos de CD20 también son afectados por la expresión de FcγRIIb. Por lo tanto, examinamos mAb dirigidos a otros antígenos diana (CD 19 y MHCII) y si el bloqueo de mAb de FcγRIIb reduciría su internalización. Estos datos muestran que la modulación de mAb de CD 19 también se reduce
bloqueando FcγRIIb.

30 **Ejemplo 20.** Internalización con otros antígenos de superficie también puede efectuarse por expresión de CD32b.

Las células de Ramos no tienen CD32b y de esta manera demuestran el nivel de internalización en ausencia de CD32B. Si el antígeno es capaz de internalizarse por CD32b, expresarlo luego (en las células de Ramos-CD32B) incrementará el nivel de internalización.

Las versiones etiquetadas con Alexa-488 de cada mAb fueron incubadas con células de Ramos transfectadas pCDNA3 o células de Ramos transfectadas por CD32B durante 24h y el alcance de la modulación se determina
35 como antes. * = p<0,05. La figura 33 mostró que la internalización con otros antígenos también se efectúa mediante expresión de CD32b.

Materiales y procedimientos

Células

40 Fueron obtenidas líneas celulares humanas (Daudi, Raji, Ramos) de ECACC y fueron mantenidas en RPMI (Invitrogen, Reino Unido), complementadas con suero fetal bovino al 10 % (FCS) (Lonza, Reino Unido) y glutamina y piruvato (ambos de Invitrogen) y cultivadas a 37 °C, 5 % CO₂. Células de Ramos Rx3 que carecen de expresión de BCR fueron generadas previamente (36). Las células transfectantes de Ramos FcγRIIb y las células de control transfectadas con vectores vacíos (negativos de FcγRIIb) fueron descritas previamente (36), y mantenidas en RPMI
45 complementado tal como antes, con la adición de Geneticin (Invitrogen, UK). Las células Rx3 transfectadas con FcγRIIb y los vectores vacíos fueron producidos y mantenidos de la misma manera. La expresión de superficie de FcγRIIb fue determinada mediante citometría de flujo usando AT10 etiquetado con PE (descrito más adelante). Las poblaciones de transfectantes de Ramos FcγRIIb que expresan niveles bajos, medios o altos de FcγRIIb fueron clasificados usando un citómetro de flujo FACS Aria (BD Biosciences, Estados Unidos de América).

50 Donantes de sangre

Las células B humanas normales fueron obtenidas de voluntarios sanos con consentimiento informado. La sangre periférica fue tomada en K₂E o en LiH, los linfocitos fueron separados usando Lymphoprep (Axis-Shield, Reino

Unido) según el protocolo del fabricante y las células B fueron aisladas mediante selección negativa con el kit II de aislamiento de células B humanas II (Miltenyi Biotec, Alemania).

Muestras clínicas

5 Las muestras de CLL/SLL, FL, DLBCL y MCL fueron obtenidas con consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras de sangre fueron recogidas en K₂E o LiH con Lymphoprep y el tejido sólido fue desagregado por medio de un filtro estéril y fueron centrifugadas. Las células fueron crio-preservedas en RPMI complementado con suero AB humano al 50 % y DMSO al 10 % y almacenadas en el banco de tumores de la división de ciencias de cáncer de la University de Southampton de acuerdo con la licencia de la autoridad de tejido humano. La aprobación ética para el uso de muestras clínicas fue obtenida por NHS Trust del hospital de la Universidad de Southampton del Comité de ética de investigación de Southampton y South West Hampshire. Para células de CLL, fue determinado el estatus de mutación de los genes de IgVH (33) y la positividad de CD38 (44) tal como se detalló previamente. Brevemente, para análisis de IgVH, se usó una mezcla de imprimador líder de VH y un imprimador de C_H100 para amplificar genes de cadena pesada de ADNc. Todas las secuencias de nucleótidos fueron alineadas al directorio de base V y fue determinado el estatus mutacional usando un límite de 98 %. Para análisis de CD38, fue usado PE anti-CD38 (clon HB7; BD Biosciences). La determinación del estatus de ZAP-70 se llevó a cabo tal como se describe por Crespo et al. (30). La expresión de Ig de superficie de las células de CLL fue determinada por citometría de flujo, tal como se ha descrito previamente (45, 46).

Ensayo de viabilidad

20 Las células fueron evaluadas para viabilidad mediante citometría de flujo, siguiendo a un teñido con anexina V y PI etiquetadas con FITC tal como se ha detallado previamente (25).

Anticuerpos y reactivos

25 Rituximab fue regalado por la farmacia de Oncología del Hospital General de Southampton. Rit m2a (rituximab con región Fc de IgG2a de ratón), y WR17 (anti-CD37), todos IgG2a de ratón, fueron producidos tal como se ha descrito previamente (18). El mAb anti-FcγRII (AT10) fue producido en las instalaciones propias y ha sido descrito previamente (47). Tositumomab fue regalado por el profesor Tim Illidge (Manchester, Reino Unido). Ofatumumab y GA101gly (GA101 glicosilado con región de Fc no modificada) fueron producidos en las instalaciones propias a partir de secuencias publicadas en patentes. NB: estos mAb fueron producidos en células CHO o 293F y de esta manera pueden diferir (por ejemplo en sus estructuras de carbohidratos) de los mAb producidos para su uso clínico. Los reactivos Alexa-488 y anti-Alexa 488 fueron comprados en invitrogen. La producción de fragmentos de F(ab')₂ ha sido descrita previamente (48). Los fragmentos Fab' fueron generados mediante incubación con 2-mercaptoethanol de 20 mM a 25 °C, durante 30 minutos, seguido de la adición de yodoacetamida en exceso. Los anticuerpos de transferencia Western usados fueron anti-actina (AC74, Sigma, Reino Unido) y anti-fosfo-FcγRIIb (Cell Signaling Technology, Reino Unido).

Citometría de flujo

35 Los mAb etiquetados con fluorocromo fueron obtenidos de BD Biosciences o hechos en instalaciones propias. Los mAb fueron conjugados con Alexa 488 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La citometría de flujo ha sido descrita previamente (49). Las muestras fueron evaluadas en un FACScan o en FACSCalibur y los datos fueron analizados con CellQuest Pro (todos de BD Biosciences) o FCS Express (DeNovo Software, Estados Unidos de América). Las células B fueron identificadas con CD19 anti-humano etiquetado con APC (en instalaciones propias) y se determinó la expresión de FcγRIIb usando AT-10 etiquetado con PE (instalaciones propias). Para controlar la variación inter-experimental, la expresión de FcγRIIb fue representada como la proporción de FcγRIIb: control de isotipo Geo intensidad de fluorescencia media (MFI).

Ensayo de internalización

45 El ensayo de internalización fue realizado tal como se detalló previamente (28). Brevemente, fueron incubadas 2-4 x 10⁵ células por pozo con mAb etiquetado con Alexa a una concentración final de 5 µg /ml. Las muestras fueron cosechadas después de 1, 2, 6 y/o 24 h, lavadas dos veces, resuspendidas, incubadas a 4 °C durante 30 minutos con anti-CD19 etiquetado con APC, con o sin el anticuerpo de extinción, anti-Alexa-488 (Invitrogen). Luego las muestras se lavaron una vez y se analizaron en un citómetro de flujo.

50 Para investigar la interacción de la región Fc de mAb anti-CD20 enlazado a las células con FcγRIIb en células adyacentes, las células de Ramos, que son FcγRIIb-ve, fueron etiquetadas con PKH26 (Sigma Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Las células etiquetadas con PKH26 fueron luego cultivadas conjuntamente con números iguales (2,5 x 10⁵ células) de células de Ramos transfectadas con FcγRIIb. Ambos tipos de célula fueron cultivados solos en calidad de controles. El ensayo de internalización fue realizado luego tal como se ha descrito antes, y la modulación fue comparada en poblaciones etiquetadas y no etiquetadas con PKH26. Otras variaciones de este ensayo de cultivo conjunto se describen en las leyendas de las figuras.

55

Transferencia Western

El protocolo ha sido descrito previamente (36). Brevemente, $\sim 2 \times 10^6$ células por pozo fueron incubadas con mAb (5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras fueron separadas luego mediante SDS PAGE y las proteínas fueron transferidas inmediatamente a una membrana de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con leche seca, no grasosa, al 5 % en p/v, incubadas con los anticuerpos primarios apropiadamente diluidos, lavadas y luego incubadas con IgG anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich) y fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL, GE Healthcare, Reino Unido o Pierce Biotechnology, Reino Unido) y exposición a película sensible a la luz (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Reino Unido) o el sistema de captura de imágenes de Biospectrum AC (UVP, Reino Unido).

10 Microscopía óptica y confocal

Para determinar el tráfico intracelular de mAb anti-CD20 y Fc γ RIIb, las células de CLL fueron incubadas con mAb apropiado, etiquetado con Alexa 488, por varias veces, tal como se ha descrito en las leyendas de la figura, y luego fueron cosechadas, lavadas y fijadas con paraformaldehído al 2 %. Para detección de Fc γ RIIb y LAMP-1, respectivamente, las células fueron impermeabilizadas luego con saponina al 0,3 % en incubadas con AT10 F(ab')₂ etiquetado con Alexa-647 (el etiquetado fue realizado con el kit de etiquetado Alexa Fluor-647 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante) y/o CD107a anti-humano, conjugado con biotina (LAMP-1) (eBioscience, Reino Unido). Luego las células fueron lavadas y se adicionó estreptavidina-Alexa Fluor-547 (Invitrogen), seguido de más lavado. Luego se transfirieron las células a portaobjetos y se capturaron imágenes usando el software LAS-AF v2 en un microscopio confocal de barrido láser TCS-SP5 (Leica Microsystems, Reino Unido) (visor de 10x, lente objetivo de 100x).

Para determinar la proximidad de la célula a diferentes diluciones de células, las células fueron sembradas a 1-20 $\times 10^5/\text{ml}$, fueron estimuladas con diversos mAb durante 2 y/o 6 h y luego su proximidad relativa fue evaluada mediante microscopía óptica. Las células fueron vistas con un microscopio invertido Olympus CKX21 (Olympus, Reino Unido) usando una lente 10x o 20x/0,25 PH. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital enfriada CCL2 (Olympus) y fueron procesadas con software Cell B (Olympus Soft imaging solutions) y Adobe Photoshop versión CS2 (Adobe, San Jose, CA).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando GraphPadPrism (GraphPad Software, Estados Unidos de América). Los datos emparejados, no paramétricos fueron analizados usando el ensayo emparejados de Wilcoxon mientras que los datos no emparejados fueron analizados usando el ensayo de Mann-Whitney.

Composiciones, formulaciones y modo de administración ejemplares

La invención proporciona composiciones para su uso o usos para tratamiento, profilaxis y composiciones para su uso o usos para tratamiento, profilaxis, y mejora de uno o más síntomas asociados con cáncer o una enfermedad inflamatoria mediante la administración a un sujeto o un paciente de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica tal como se define en las reivindicaciones.

En una forma específica de realización, el sujeto paciente es un animal, preferiblemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, reses, porcinos, equinos, felinos, caninos, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, un simio tal como un simio cynomolgos y un humano). En una forma preferida de realización, el sujeto es un humano.

Se conocen diversos sistemas de entrega y pueden usarse para administrar una composición para su uso de la invención, por ejemplo encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, etc.

En algunas formas de realización, las composiciones para su uso de la invención se formulan en liposomas para entrega dirigida de los anticuerpos de la invención. Los liposomas son vesículas que están comprendidas por bicapas fosfolipídicas ordenadas concéntricamente que encapsula en una fase acuosa. Los liposomas comprenden normalmente diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos. Los componentes de liposomas se disponen en una configuración de bicapa, que es similar a la disposición de lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas son vehículos de entrega particularmente preferidos que se debe, en parte, a su biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y baja toxicidad. Los procedimientos para preparación de liposomas son conocidos en la técnica y se incluyen dentro de la invención, véase por ejemplo Epstein et al, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82: 3688; Hwang et al, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77: 4030-4; patentes estadounidenses Nos. 4,485,045 y 4,544,545.

Los procedimientos de administración de las composiciones para su uso de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y por la mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una forma específica de realización, las

composiciones para su uso de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, por la mucosa oral, la mucosa rectal y la mucosa intestinal, etc.) y puede administrarse conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo usando un inhalador o un nebulizador y una formulación con un agente de aerosol. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 6,019,968; 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 cantidad de la composición para su uso de la invención que será efectiva en el tratamiento, prevención o mejoramiento de uno o más síntomas asociados con un cáncer o una enfermedad inflamatoria puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la condición y debería decidirse de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse de curvas de respuesta de dosis derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

Para anticuerpos, tal como se define en las reivindicaciones, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente, independientemente para cada anticuerpo en la combinación. Preferiblemente, la dosificación de cada anticuerpo administrado a un paciente se encuentra 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 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. En términos generales, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies, debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente son posibles con frecuencia. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención, o de los fragmentos de los mismos, pueden reducirse mejorando la absorción y la penetración al tejido de los anticuerpos por medio de modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una forma de realización, la dosificación de cada uno de los anticuerpos de las composiciones para su uso de la invención administradas a un paciente son de 0,01 mg a 1000 mg/día.

Las composiciones para su uso de la invención comprenden una cantidad efectiva profilácticamente o terapéuticamente de una molécula de un primer anticuerpo y una molécula de un segundo anticuerpo según se reivindica y un soporte aceptable farmacéuticamente.

En una forma específica de realización, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora o listada en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra Farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, o vehículo con el cual se administra el producto terapéutico. Tales soportes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerina como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares.

En diversas formas de realización, una molécula de un primer anticuerpo y una molécula de un segundo anticuerpo, según se reivindican, pueden administrarse simultáneamente o separadas por menos de 1 hora, separadas por aproximadamente 1 hora, separadas desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, separadas desde aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, en aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separadas desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separadas desde aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separadas desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separadas desde aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separadas desde aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separadas desde aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separadas desde aproximadamente 10 horas a aproximadamente 100 horas, separadas desde aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separadas en no más de 24 horas o separadas en no más de 48 horas. En formas preferidas de realización, se administran dos o más componentes dentro de la misma visita del paciente.

Las cantidades y frecuencias de dosificación suministradas en la presente memoria se incluyen en los términos terapéuticamente efectivo y profilácticamente efectivo. La dosificación y la frecuencia variarán normalmente aún más

según los factores específicos para cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos que se administren, la severidad y el tipo de enfermedad, la vía de administración así como también la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia médica pasada del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por alguien experto en la materia considerando dichos factores y siguiendo por ejemplo las dosificaciones reportadas en la bibliografía y recomendados en el Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002).

Sumario

Recientemente encontramos que un mAAb de tipo I como el rituximab modula desde la superficie de células B de ratón Tg CD20 humano (in vitro e in vivo) y desde ciertas células tumorales primarias derivadas de los pacientes con NHL, limitando de esta manera su capacidad para captar efectores y agotar células diana (28). Hemos considerado un mecanismo posible para explicar la limitación de la actividad terapéutica de rituximab y otro mAAb de CD20 de tipo I y, de manera importante, suministra una oportunidad para bloquear o impedir este procedimiento y, de esta manera, desarrollar reactivos más potentes. El presente trabajo proporciona razones a nivel molecular para la modulación de CD20 inducida por rituximab y ofatumumab. La expresión de FcγRIIb debe proporcionar un marcador importante de pronóstico para respuesta a mAAb anti-CD20 de tipo I. Cuando se cultivaron células primarias de CLL/SLL con mAAb anti-CD20 de tipo I, se observó una modulación significativa pero heterogénea de CD20, y esta heterogeneidad no pudo enlazarse a factores conocidos de pronóstico en CLL. El análisis de otros subtipos de B-NHL mostró que MCL exhibía modulación heterogénea similar a CLL, pero que FL y notablemente DLBCL mostraba significativamente menos modulación. Con base en estos resultados reportamos ahora una correlación cercana entre el nivel de expresión de FcγRIIb en estas malignidades y el alcance al cual modulan en un cultivo de 6 horas. Además, sugerimos que esta modulación podría explicar algo de la heterogeneidad en respuesta al rituximab vista en estas enfermedades. El rituximab tiene el mayor beneficio probado en DLBCL y FL, donde se ha establecido una terapia de primera línea en combinación con la quimioterapia. Por contraste, ha resultado ser más difícil de demostrar un mejoramiento en OS en CLL con rituximab (39), y sus beneficios en MCL son incluso más modestos (5). Por lo tanto, como un hallazgo general, fue más probable que las malignidades de células B que expresan FcγRIIb modularan CD20 y tienden a beneficiar menos del tratamiento con rituximab. Sin embargo, incluso dentro de DLBCL y FL, algunos casos no responden a rituximab. Como ejemplo, los casos de FL transformada generalmente tienen mala respuesta a la terapia y expresan FcγRIIb (21), una observación consistente con nuestros propios hallazgos de que una de las muestras que expresan FcγRIIb alto (Figura 2C) fue identificada como una FL y demostró de manera correspondiente altas velocidades de modulación. Aunque en un único caso, sentimos que esto podría proporcionar potencialmente un medio importante de resistencia a rituximab.

La modulación de CD20 mostró una correlación fuerte con el nivel de expresión de FcγRIIb independientemente del subtipo de enfermedad B-NHL. Fue sugerido previamente que FcγRIIb podría inhibir la eficacia terapéutica de mAAb compitiendo con receptores activadores de Fc en células efectoras, inhibiendo de esta manera la señalización citotóxica (40). Nuestras investigaciones in vitro sugieren que rituximab entrecruza CD20 y FcγRIIb de manera predominante en la misma célula, lo que da lugar a una activación de FcγRIIb y a la rápida internalización emparejada tanto de antígenos de superficie conjuntamente con mAAb enlazado a lisosoma para degradación. La expresión de FcγRIIb parece dar lugar a un reclutamiento disminuido de célula efectora por medio de su capacidad para inhibir la expresión superficial del mAAb en la célula diana.

También mostramos que la co-incubación con un mAAb que bloquea anti-FcγRIIb fue capaz de impedir tanto la activación de FcγRIIb como la rápida internalización de rituximab. En total, estos datos confirman el enlace directo entre activación de FcγRIIb y rápida internalización de mAAb desde la superficie de la célula.

La fuerte correlación entre la modulación de CD20 inducida por mAAb anti-CD20 de tipo I a través de diferentes subtipos de B-NHL y la expresión de FcγRIIb, junto con nuestros estudios de transfección sugieren que FcγRIIb es un regulador clave de la modulación de CD20.

Otros grupos han investigado el papel de FcγRIIb en linfomas. Camilleri-Broet et al (20) no pudieron mostrar una relación significativa entre la respuesta a R-CHOP y la expresión de FcγRIIb en DLBCL; sin embargo, solamente el 18 % (42/234 de los casos) fueron considerados positivos de FcγRIIb mediante inmunohistoquímica en la serie anterior (21). Dada la relativamente baja frecuencia de positividad, es probable que la cantidad de casos positivos puedan haber sido insuficientes para detectar una diferencia. Más que una sobre-expresión, Weng y Levy (24) investigaron si dos alelos de FcγRIIb (el alelo 232I que es más eficiente en la regulación de calcio mediada por BCR que el alelo 232T en enfermedad autoinmune (22, 23)), estaban ligados a la eficacia de rituximab pero no pudieron demostrar una correlación entre este polimorfismo y la respuesta a la terapia con solo agente rituximab en pacientes con FL. la mayor preocupación planteada por los mismos autores fue que solamente 17 pacientes poseían el alelo 232T, lo cual limitaba nuevamente el poder estadístico del estudio. Adicionalmente, los polimorfismos estudiados reflejaron la eficiencia de la inhibición de BCR en una enfermedad autoinmune y no hay observaciones publicadas que indiquen que estos polimorfismos son relevantes en linfomas o la influencia de enlace de FC de IgG1 humano. La expresión de FcγRIIb, a través de su capacidad para regular la velocidad de internalización será un indicador importante de pronóstico sobre el éxito de la inmunoterapia con mAAb de tipo I (que incluyen rituximab y ofatumumab). Puede tener un efecto menos pronunciado después de la terapia con mAAb de tipo II.

Además, en dos modelos diferentes in vivo, hemos demostrado la capacidad de CD32 para limitar la eficacia de mAb y la capacidad de mAb anti-CD32b de superar esta limitación y de incrementar la terapia con rituximab.

Referencias

- 5 1. Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Ferme, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., et al. 2005. Long-term results de the R-CHOP study in the treatment de elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23:4117-4126.
- 10 2. Sehn, L.H., Donaldson, J., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Klasa, R., MacPherson, N., O'Reilly, S., Spinelli, J.J., Sutherland, J., et al. 2005. Introduction de combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 23:5027-5033.
3. Marcus, R., Imrie, K., Belch, A., Cunningham, D., Flores, E., Catalano, J., Solal-Celigny, P., Offner, F., Walewski, J., Raposo, J., et al. 2005. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 105:1417-1423.
- 15 4. Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J.V., Dmoszynska, A., Raposo, J.C., Offner, F.C., Gomez-Codina, J., Belch, A., Cunningham, D., et al. 2008. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4579-4586.
- 20 5. Lenz, G., Dreiling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., et al. 2005. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 23:1984-1992.
- 25 6. Kharfan-Dabaja, M.A., Fahed, R., Hussein, M., y Santos, E.S. 2007. Evolving role of monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1799-1815.
- 30 7. Stolz, C., y Schuler, M. 2009. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leuk Lymphoma* 50:873-885.
8. Davis, T.A., Czerwinski, D.K., y Levy, R. 1999. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expresión. *Clin Cancer Res* 5:611-615.
9. Michel, R.B., y Mattes, M.J. 2002. Intracellular accumulation of the anti-CD20 antibody 1F5 in B-lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 8:2701-2713.
- 35 10. Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., y Naoe, T. 2009. Down-regulation of CD20 expresión in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 113:4885-4893.
11. Treon, S.P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Young, G., Doss, D., Schlossman, R., y Anderson, K.C. 2001. Tumor Cell Expresión of CD59 Is Associated with Resistance to CD20 Serotherapy in Patients with B-Cell Malignancies. *J Immunother* (1991) 24:263-271.
- 40 12. Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., e Introna, M. 2001. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98:3383-3389.
13. Jazirehi, A.R., Vega, M.I., y Bonavida, B. 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res* 67:1270-1281.
- 45 14. Weng, W.K., y Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.
15. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., y Ravetch, J.V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor dianas. *Nat Med* 6:443-446.
16. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., y Tedder, T.F. 2004. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199:1659-1669.

17. Nimmerjahn, F., y Ravetch, J.V. 2007. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 19:239-245.
18. Beers, S.A., Chan, C.H., James, S., French, R.R., Attfield, K.E., Brennan, C.M., Ahuja, A., Shlomchik, M.J., Cragg, M.S., y Glennie, M.J. 2008. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 112:4170-4177.
- 5 19. Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct- and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*.
20. Camilleri-Broet, S., Mounier, N., Delmer, A., Briere, J., Casasnovas, O., Cassard, L., Gaulard, P., Christian, B., Coiffier, B., and Sautes-Fridman, C. 2004. FcγRIIB expresión in diffuse large B-cell lymphomas does not alter the response to CHOP+rituximab (R-CHOP). *Leukemia* 18:2038-2040.
- 10 21. Camilleri-Broet, S., Cassard, L., Broet, P., Delmer, A., Le Touneau, A., Diebold, J., Fridman, W.H., Molina, T.J., y Sautes-Fridman, C. 2004. FcγRIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas. *Br J Haematol* 124:55-62.
22. Li, X., Wu, J., Carter, R.H., Edberg, J.C., Su, K., Cooper, G.S., y Kimberly, R.P. 2003. A novel polymorphism in the FcγRIIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum* 48:3242-3252.
- 15 23. Kono, H., Kyogoku, C., Suzuki, T., Tsuchiya, N., Honda, H., Yamamoto, K., Tokunaga, K., and Honda, Z. 2005. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14:2881-2892.
- 20 24. Weng, W.K., y Levy, R. 2009. Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB is not associated with clinical outcome in patients with follicular lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma* 50:723-727.
- 25 25. Chan, H.T., Hughes, D., French, R.R., Tutt, A.L., Walshe, C.A., Teeling, J.L., Glennie, M.J., y Cragg, M.S. 2003. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res* 63:5480-5489.
26. Cragg, M.S., y Glennie, M.J. 2004. Antibody especificidad controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743.
27. Ivanov, A., Beers, S.A., Walshe, C.A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K.L., Potter, K.N., Murray, S., Chan, C.H., Klymenko, T., et al. 2009. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* 119:2143-2159.
- 30 28. Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T., Lim, S.H., Jarrett, J.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H.J., Cox, K.L., et al. 2010. Antigenic modulación limits the efficacy of anti-CD20 antibodies. *Blood*: In press.
29. Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., et al. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expresión profile. *Blood* 101:4944-4951.
- 35 30. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., y Montserrat, E. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-1775.
31. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-1847.
- 40 32. Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M., y Albitar, M. 2001. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:181-186.
33. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., y Stevenson, F.K. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848-1854.
- 45 34. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H., y Stilgenbauer, S. 2002. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-1416.

35. Ravetch, J.V., y Bolland, S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.
36. Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., y Cragg, M.S. 2008. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 283:16971-16984.
- 5 37. Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., y Deans, J.P. 2008. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of fosfoproteins and calmodulin binding proteins. *J Biol Chem* 283:18545-18552.
- 10 38. Ternynck, T., Dighiero, G., Follezou, J., y Binet, J.L. 1974. Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants. *Blood* 43:789-795.
39. Robak, T., Dmoszynska, A., Solal-Celigny, P., Warzocha, K., Loscertales, J., Catalano, J., Afanasiev, B.V., Larratt, L., Geisler, C.H., Montillo, M., et al. Rituximab Plus Fludarabine and Cyclophosphamide Prolongs Progression-Free Survival Compared with Fludarabine and Cyclophosphamide Alone in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*.
- 15 40. Fridman, W.H., Teillaud, J.L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C., y Sautes, C. 1993. Soluble Fc gamma receptors. *J Leukoc Biol* 54:504-512.
41. Nimmerjahn, F., y Ravetch, J.V. 2008. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:34-47.
- 20 42. Aman, M.J., Tosello-Trampont, A.C., y Ravichandran, K. 2001. Fc gamma RIIB1/SHIP-mediated inhibitory signaling in cells B involves lipid rafts. *J Biol Chem* 276:46371-46378.
43. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., y Glennie, M.J. 2003. Complement-mediated lysis by mAb anti-CD20 correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101:1045-1052.
- 25 44. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Thomas, P.W., Stevenson, F.K., and Oscier, D.G. 2002. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99:1023-1029.
45. Mockridge, C.I., Potter, K.N., Wheatley, I., Neville, L.A., Packham, G., y Stevenson, F.K. 2007. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 109:4424-4431.
- 30 46. Potter, K.N., Mockridge, C.I., Neville, L., Wheatley, I., Schenk, M., Orchard, J., Duncombe, A.S., Packham, G., y Stevenson, F.K. 2006. Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 12:1672-1679.
47. Greenman, J., Tutt, A.L., George, A.J., Pulford, K.A., Stevenson, G.T., y Glennie, M.J. 1991. Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a biespecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol Immunol* 28:1243-1254.
- 35 48. Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., y Stevenson, G.T. 1987. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)₂ antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol* 139:2367-2375.
49. Tutt, A.L., French, R.R., Illidge, T.M., Honeychurch, J., McBride, H.M., Penfold, C.A., Fearon, D.T., Parkhouse, R.M., Klaus, G.G., y Glennie, M.J. 1998. Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors. *J Immunol* 161:3176-3185.
- 40 50. Beer, S.A. et al. 2010. *Seminars in Haematology* 47(2):pp107-114
51. Niederfellner, G et al. 2011. *Blood* 118, 358-367.
52. Teeling, J.L. 2004. *Blood* 104, 1793-1800.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende;

(i) una molécula de un primer anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular de una célula diana y que es capaz de internalizarse en la célula diana de una manera dependiente de FcγRIIb; dicho anticuerpo tiene un dominio Fc que es capaz de unirse a FcγRIIb, en la que el antígeno de superficie celular se selecciona de CD19, CD20 o CD40; en combinación con (ii) una molécula de un segundo anticuerpo que específicamente se une a FcγRIIb, y que impide o reduce el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula de un primer anticuerpo; y en la que la molécula del segundo anticuerpo es cualquiera de un anticuerpo; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo monocatenario, un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv o dAb;

5
10 y **se caracteriza porque** la composición es para su uso en el tratamiento de cáncer o de una enfermedad inflamatoria en un paciente con células diana que tienen un nivel elevado de expresión de FcγRIIb relativo a un control, en la que el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad.

15 2. Uso de una molécula de anticuerpo según la reivindicación 1, parte (ii), **que se caracteriza porque** el uso es en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer o de una enfermedad inflamatoria en pacientes con células diana que tienen un nivel elevado de expresión de FcγRIIb relativo a un control, en el que el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad; y en el que la molécula de anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1, parte (ii) puede administrarse en combinación con un anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1 parte (i).

20 3. Uso de expresión de FcγRIIb en células diana como un marcador de pronóstico para la respuesta de las células diana a un tratamiento con una molécula de anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1, parte (i), por lo cual los niveles elevados de FcγRIIb son indicativos de una reducción en o la ausencia de una respuesta al tratamiento con la molécula de anticuerpo, y en el que los niveles elevados de FcγRIIb son relativos a un control, en el que el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad.

25 4. Un procedimiento para predecir la respuesta de células diana de un paciente a un tratamiento con una molécula de anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1, parte (i), **que se caracteriza porque** el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión de FcγRIIb en las células diana, por lo cual los niveles elevados de FcγRIIb son relativos a un control, en el que el control es el nivel de expresión mediano en el mismo tipo de célula en pacientes que tienen la misma enfermedad, y son predictivos de una reducción en, o la ausencia de, una respuesta
30 al tratamiento con la molécula de anticuerpo.

5. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) impide o reduce el enlace del FcγRIIb presente en la célula diana al dominio Fc de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i).

35 6. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) adicionalmente impide o reduce la internalización de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) en la célula diana.

7. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquier reivindicación anterior en la que la célula diana es una célula cancerosa.

40 8. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquier reivindicación anterior en la que la célula diana es una célula B.

9. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquier reivindicación anterior en que el paciente a tratar es un paciente con cáncer y el tratamiento es un tratamiento para el cáncer.

45 10. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en que el cáncer se selecciona de linfoma de no Hodgkin, tal como linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto o leucemia linfocítica crónica.

11. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquier reivindicación anterior en la cual una o varias moléculas de anticuerpo no incluyen un dominio capaz de captar una célula efectora.

12. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según la reivindicación 11 en la que las una o más moléculas de anticuerpo, son moléculas de anticuerpo monoclonal.

13. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-12 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende las siguientes CDR:

- (i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31; o
- 5 (ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37; o
- (iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; o
- (iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49; o
- (v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55; o
- (vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61; o
- 10 (vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67; o
- (viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73; o
- (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79; o
- (x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85; o
- (xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91; o
- 15 (xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97; o
- (xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103;

y/o comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las siguientes CDR:

- (i) SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o
- (ii) SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o
- 20 (iii) SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
- (iv) SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
- (v) SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o
- (vi) SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
- (vii) SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
- 25 (viii) SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
- (ix) SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
- (x) SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
- (xi) SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
- (xii) SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
- 30 (xiii) SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.

14. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-13 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (VH) seleccionada del grupo que consiste en:

- 35 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; y SEQ ID NO: 15;

y/o comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (VL) seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 28.

- 5 15. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-14 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende las siguientes secuencias de aminoácidos de CDR:
- (i) SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; o
 - (ii) SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40; o
 - (iii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46; o
 - (iv) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52; o
 - 10 (v) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; o
 - (vi) SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64; o
 - (vii) SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70; o
 - (viii) SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76; o
 - (ix) SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 82; o
 - 15 (x) SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88; o
 - (xi) SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 y SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 y SEQ ID NO: 94; o
 - (xii) SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 99 y SEQ ID NO: 100; o
 - (xiii) SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106.
- 20 16. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-15 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:
- (i) SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16; o
 - (ii) SEQ IS NO: 4 y SEQ ID NO: 17; o
 - (iii) SEQ IS NO: 5 y SEQ ID NO: 18; o
 - 25 (iv) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 19; o
 - (v) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 20; o
 - (vi) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 21; o
 - (vii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 22; o
 - (viii) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 23; o
 - 30 (ix) SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 24; o
 - (x) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 25; o
 - (xi) SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 26; o
 - (xii) SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 27; o
 - (xiii) SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28.
- 35 17. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-12 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) es capaz de competir con los anticuerpos tal como se definen en las reivindicaciones 14-16 para impedir o reducir el enlace de FcγRIIb al dominio Fc de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i).

18. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-16 en la que la molécula de anticuerpo definida en (ii) impide o reduce la señalización de FcγRIIb.
- 5 19. Una composición para el uso, o un uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5-18 en la que la molécula de anticuerpo tal como se define en (ii) impide o reduce la internalización de la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) por la célula diana.
20. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según cualquier reivindicación previa, en la que el antígeno de superficie celular es CD20 y la molécula de anticuerpo tal como se define en (i) es un anticuerpo de CD20.
- 10 21. Una composición para el uso, o un uso o procedimiento según la reivindicación 20 en la que el anticuerpo de CD20 es un anticuerpo de CD20 de tipo I.

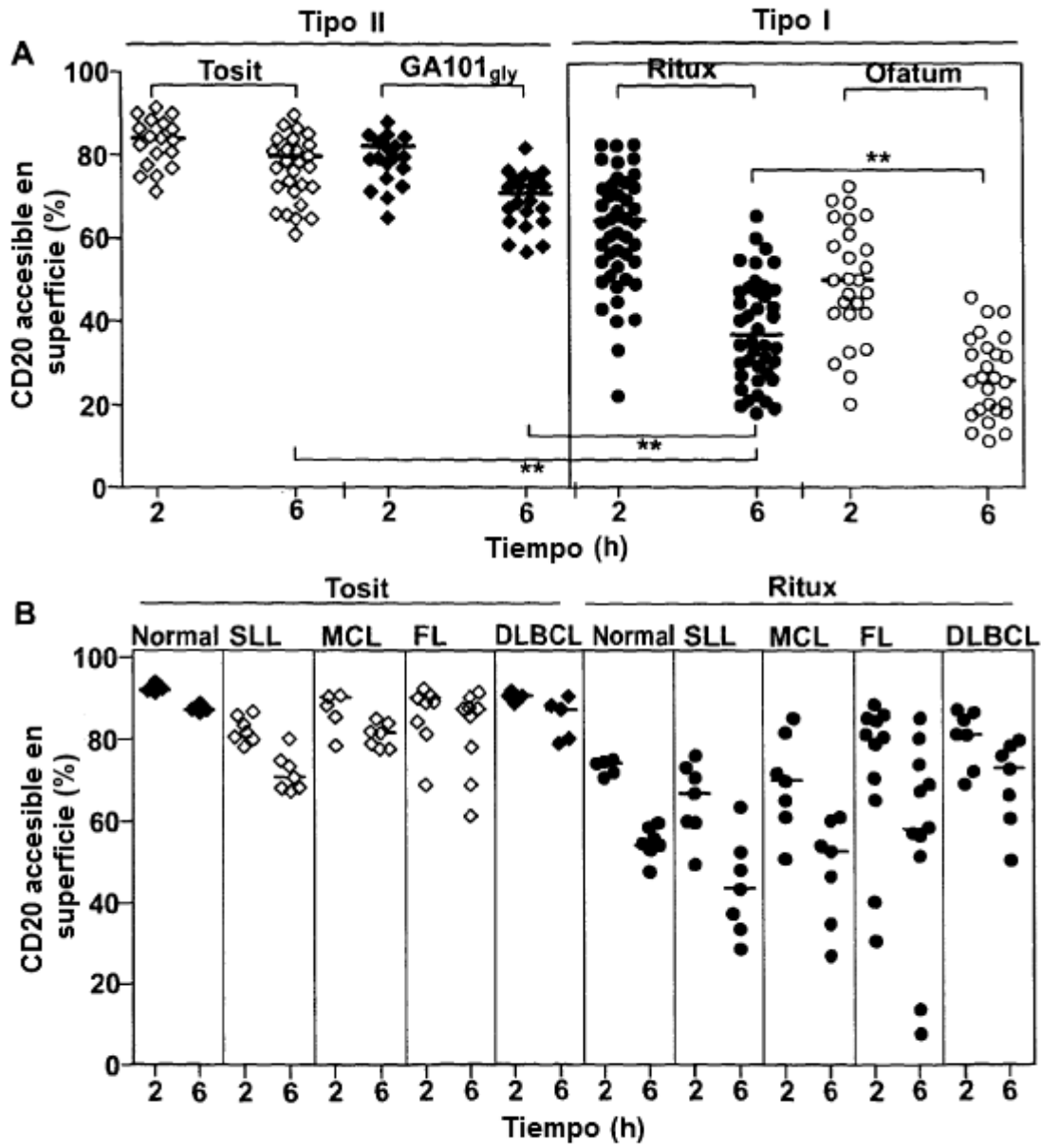


Fig. 1

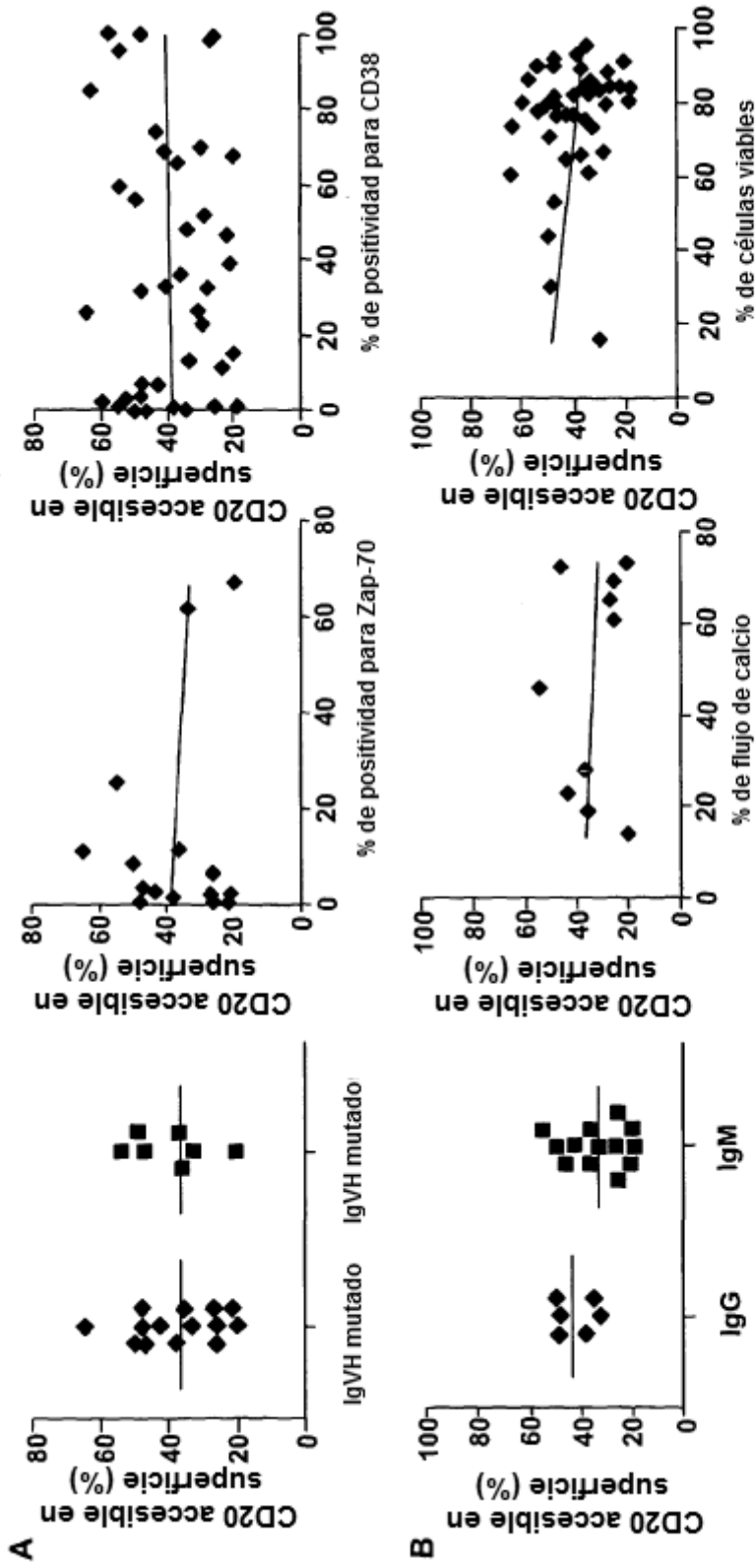


Fig. 1 complementaria

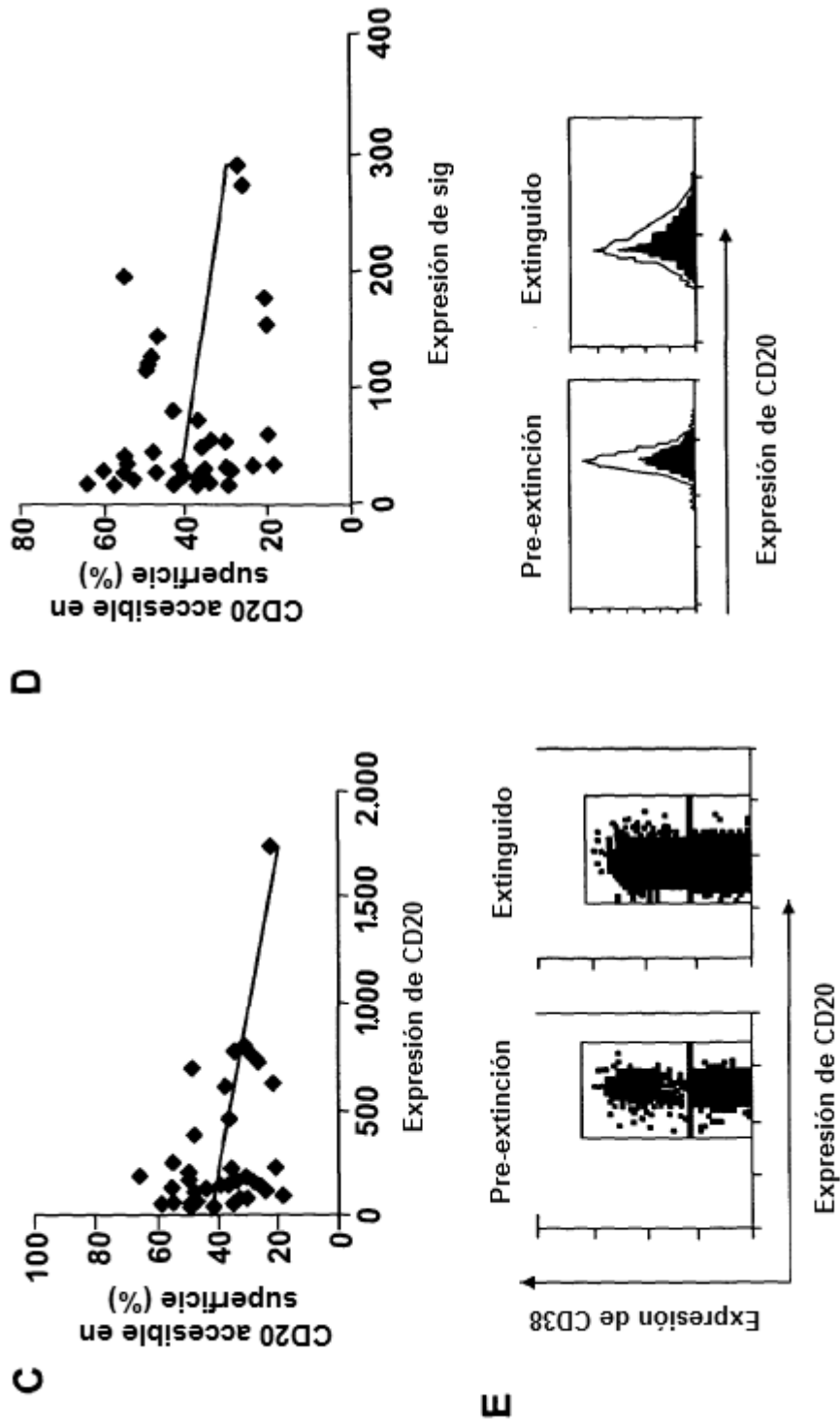


Fig. 1 complementaria (continuación)

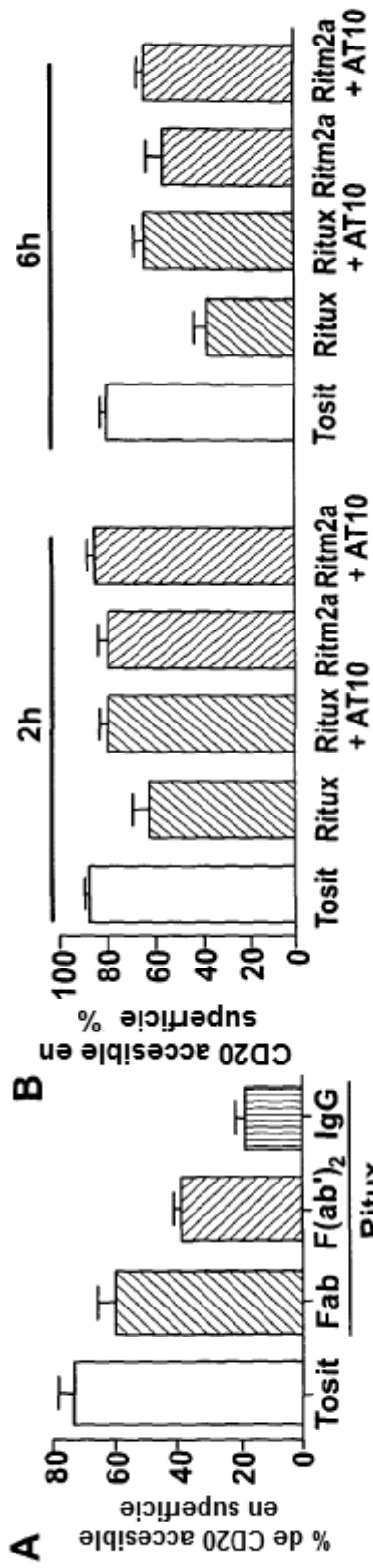


Fig. 2

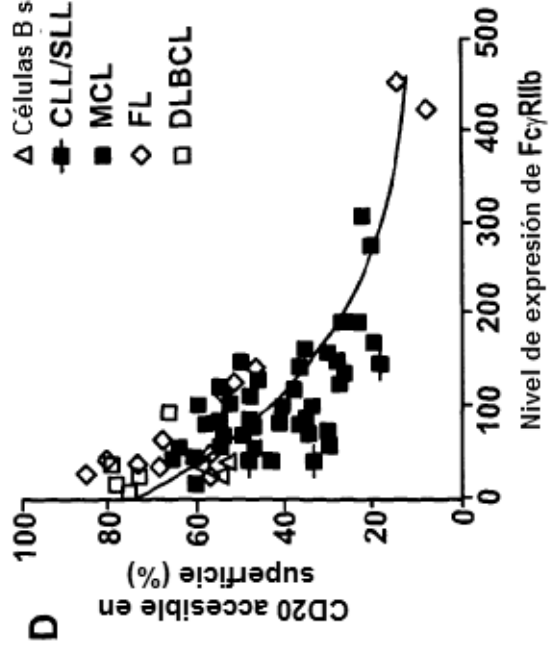
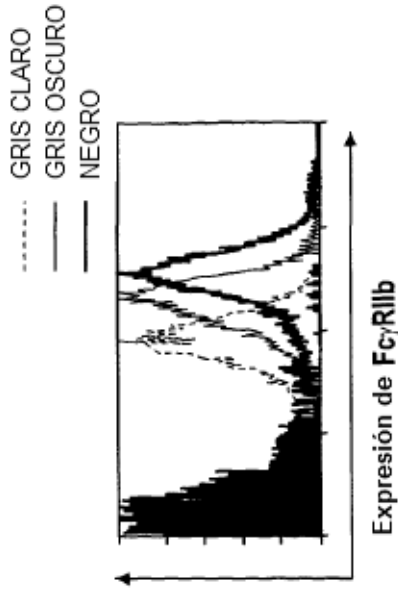
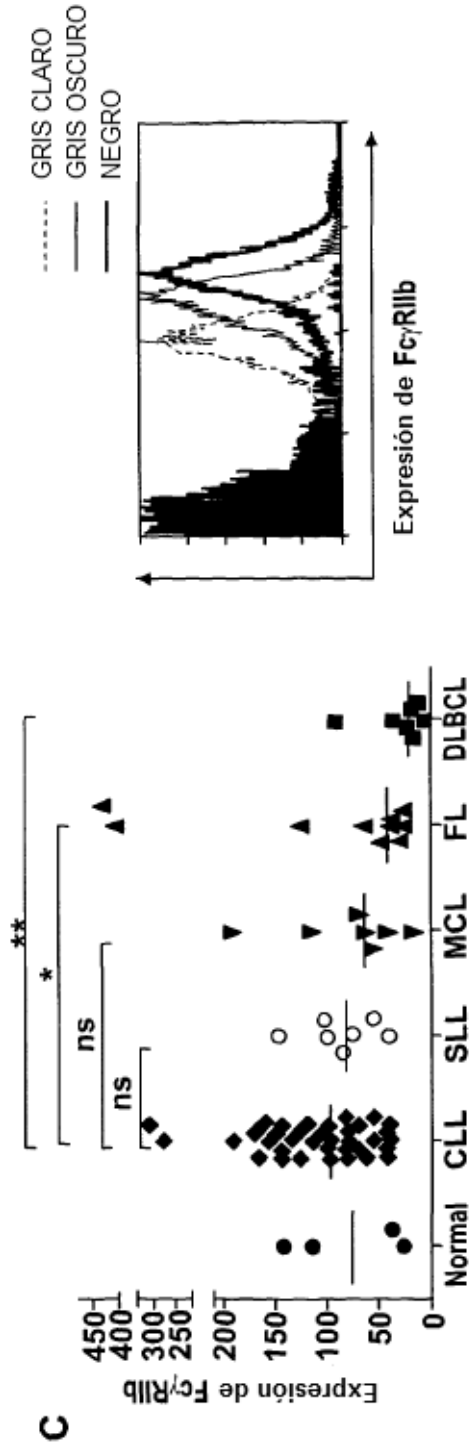


Fig. 2 (continuación)

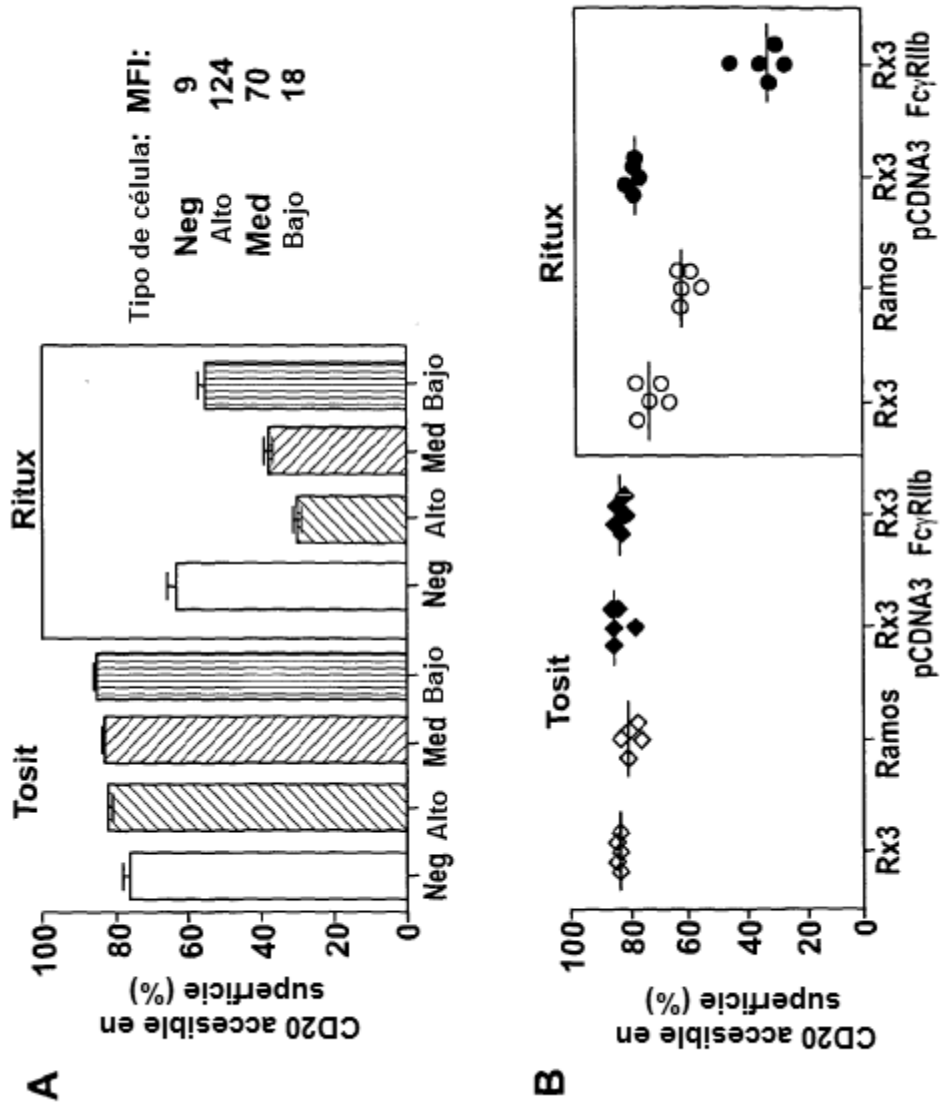


Fig. 3

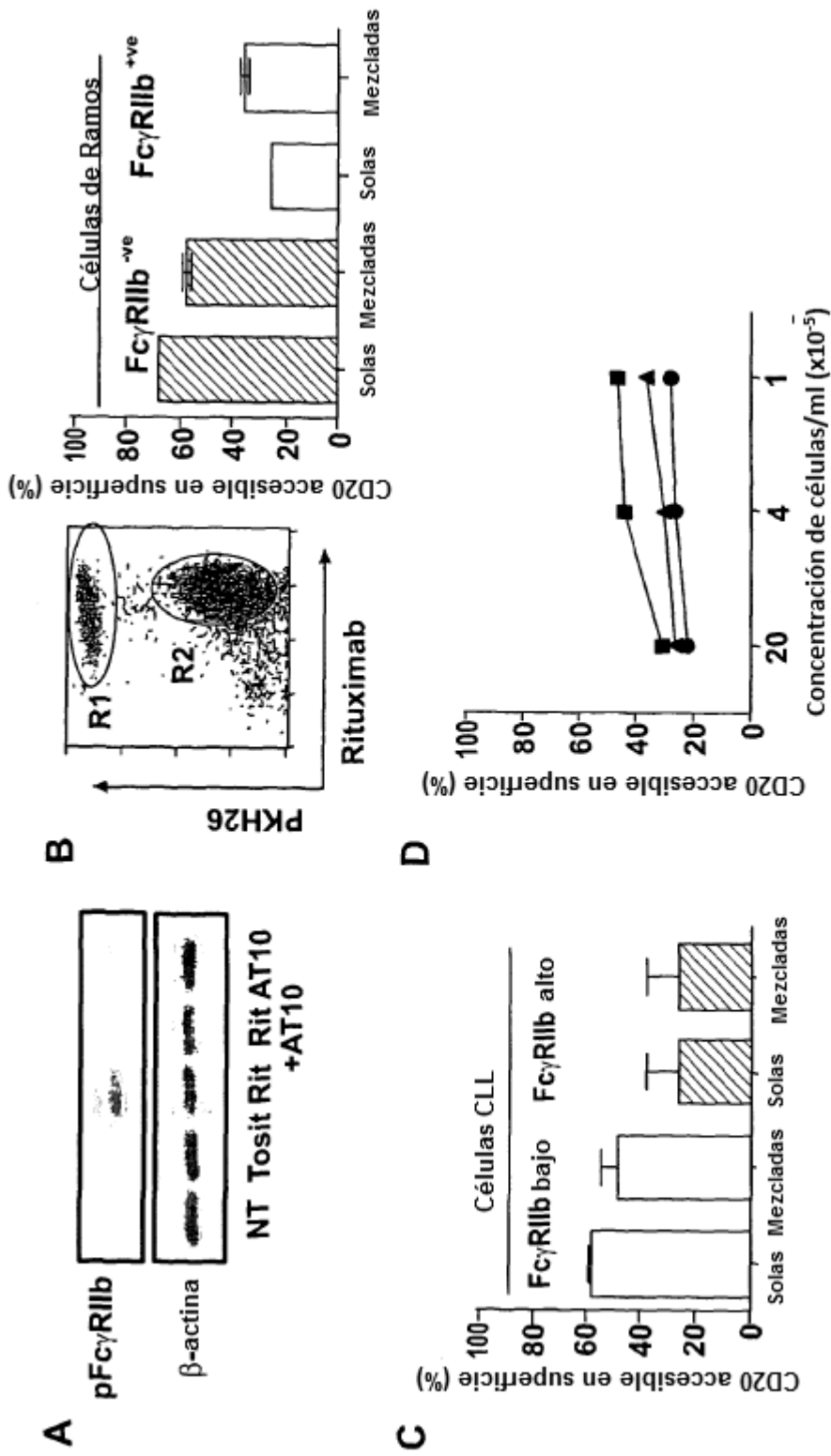


Fig. 4

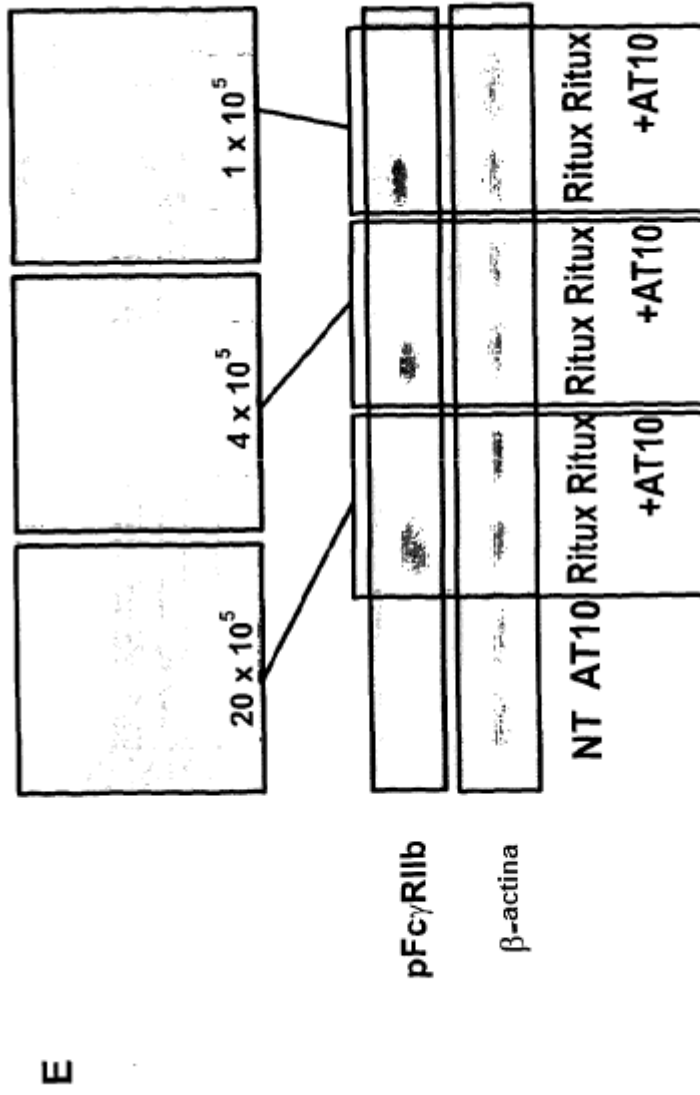


Fig. 4 (Continuación)

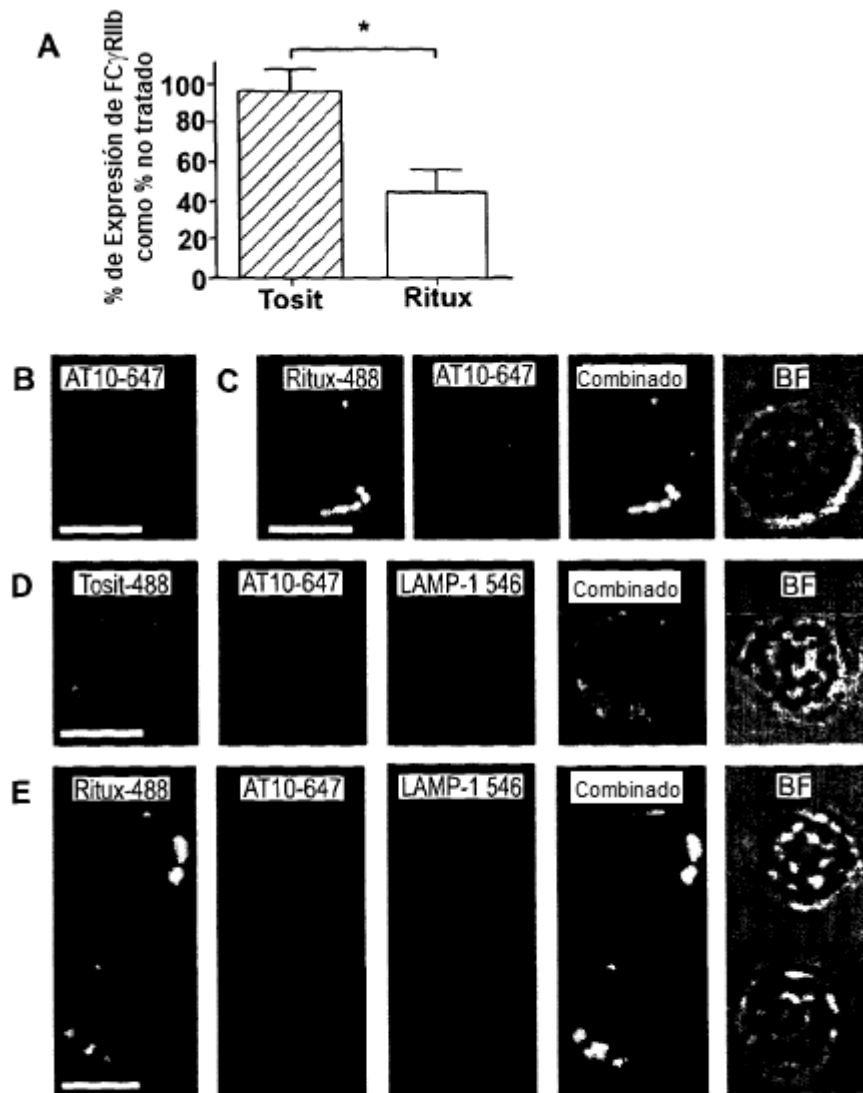


Fig. 5

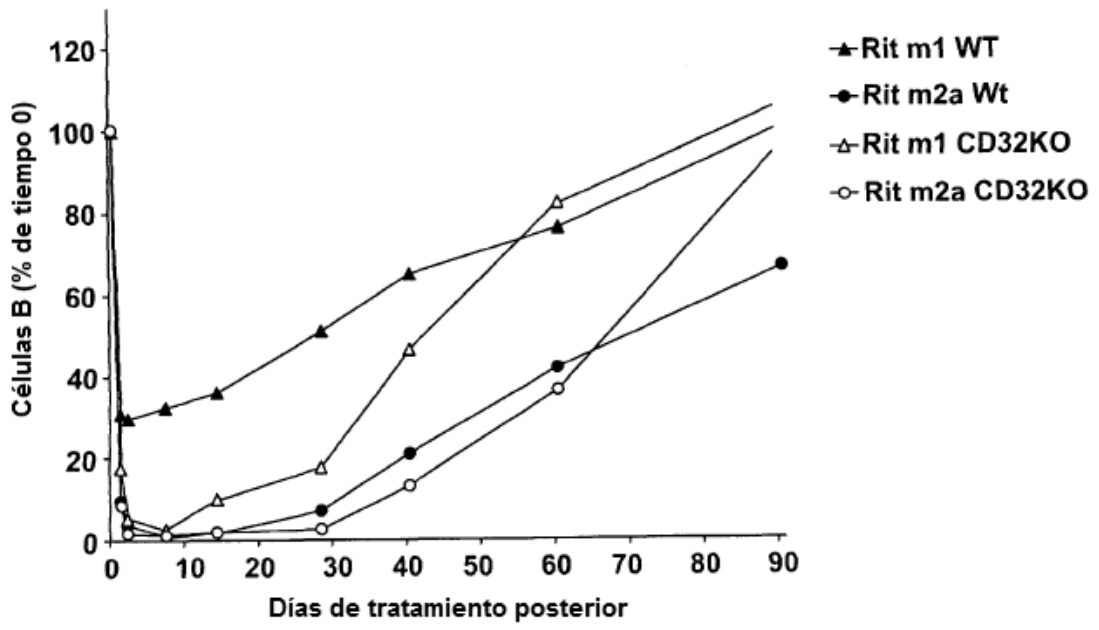


Fig. 6

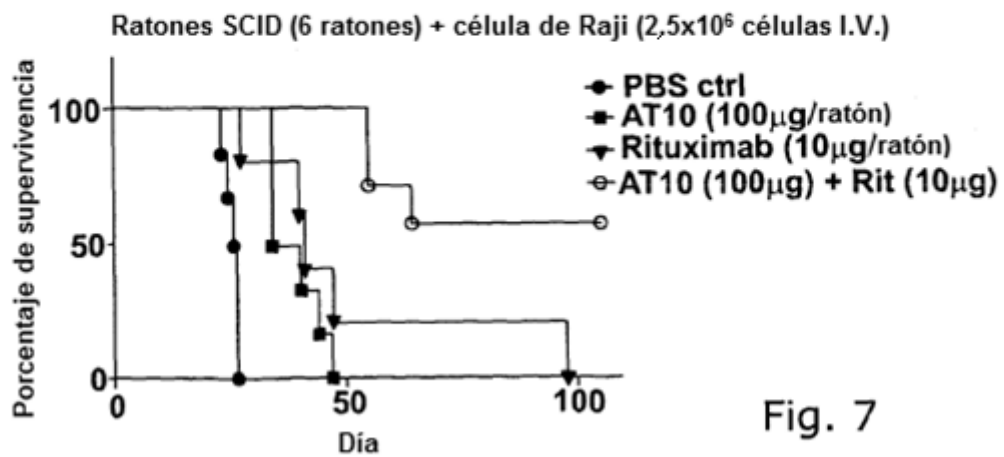
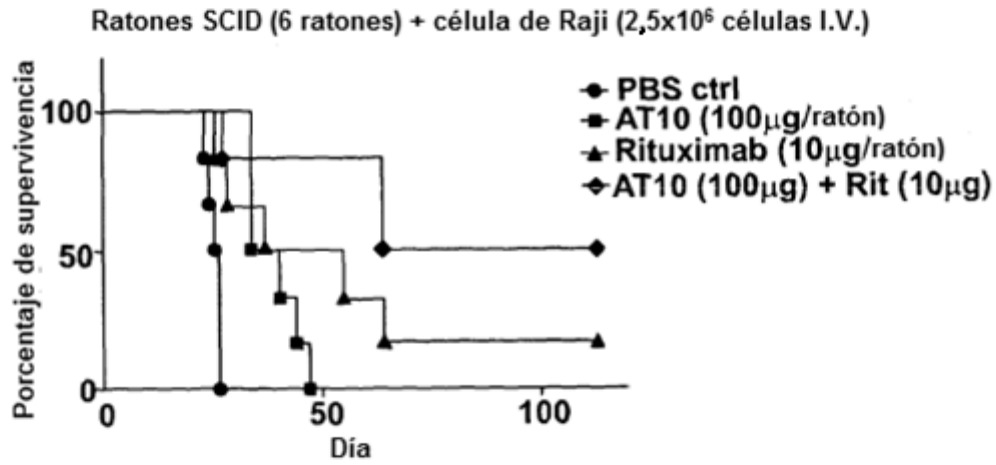
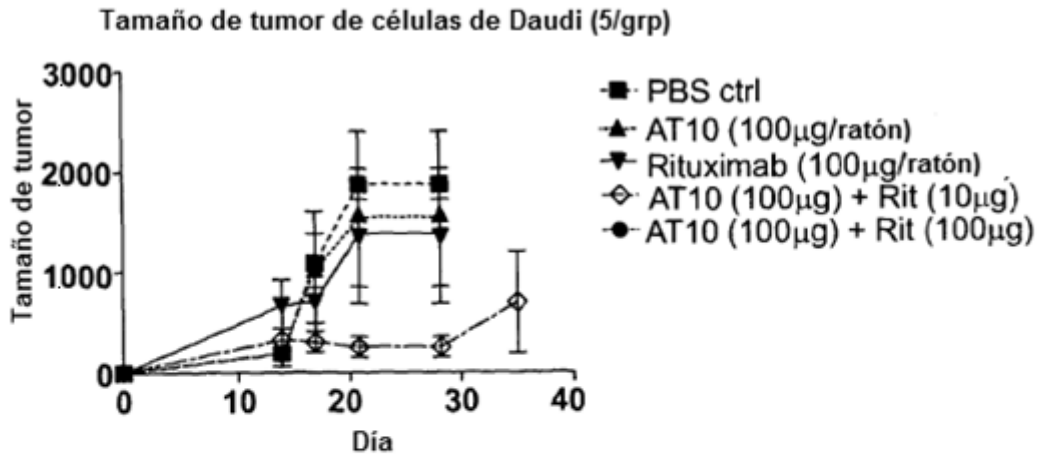


Fig. 7

**Inhibición de Fc γ RII con AT-10-F(ab') $_2$
aumenta potencial fagocítico de rituximab**

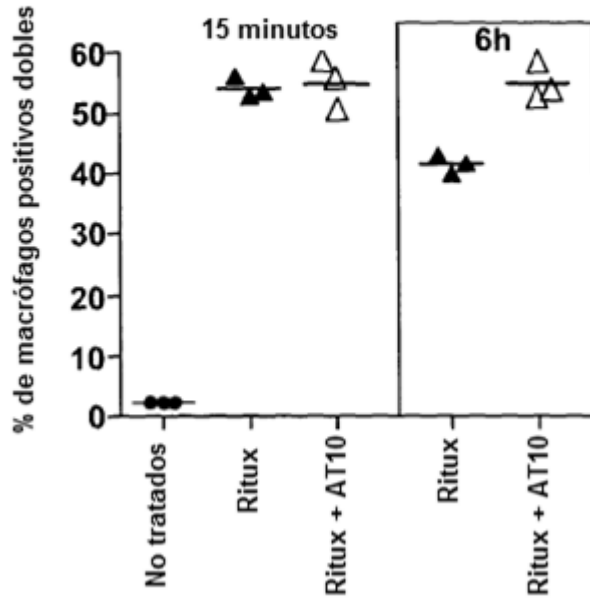


Fig. 8

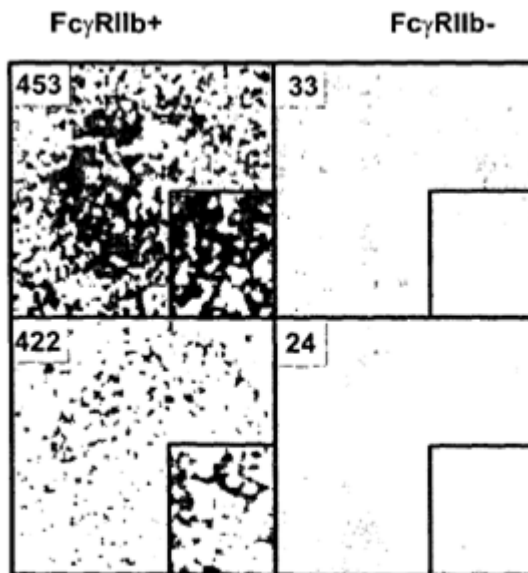


Fig. 9

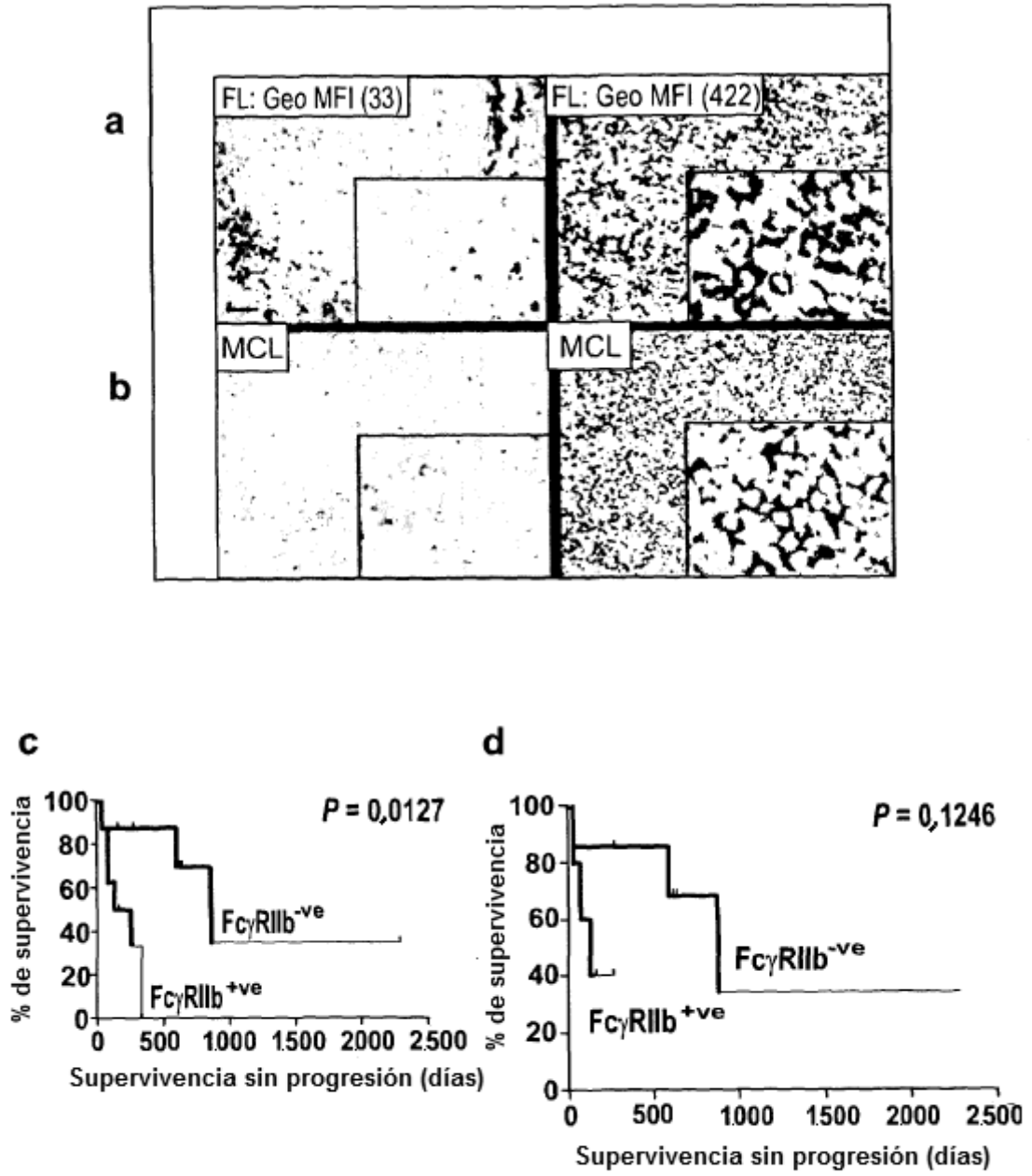


Fig. 10

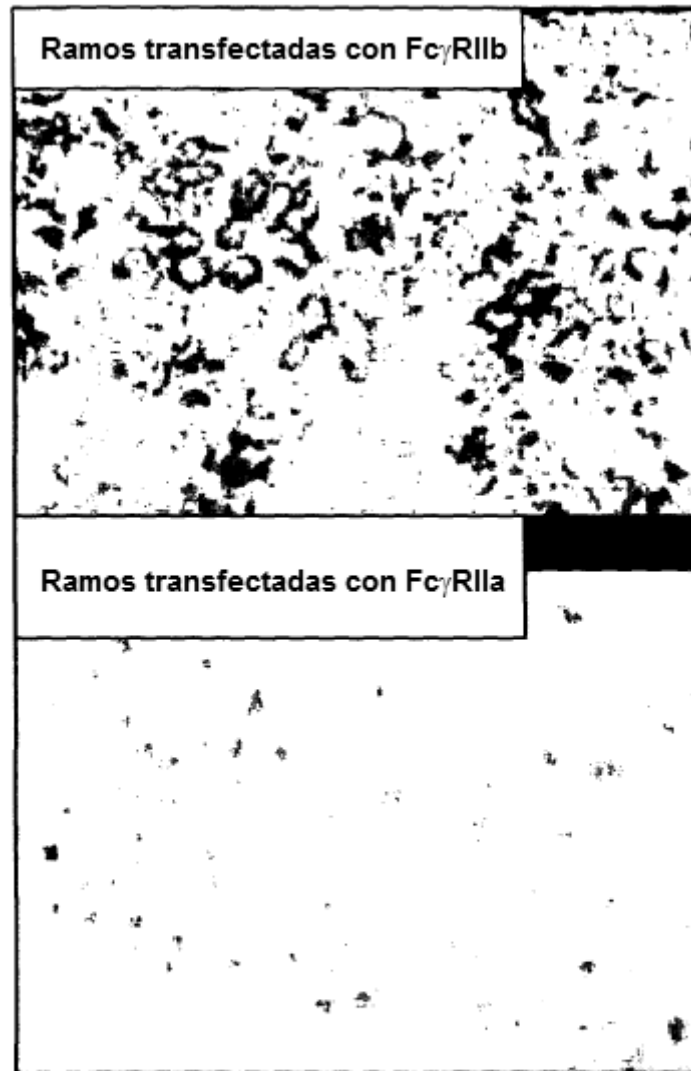


Fig. 11

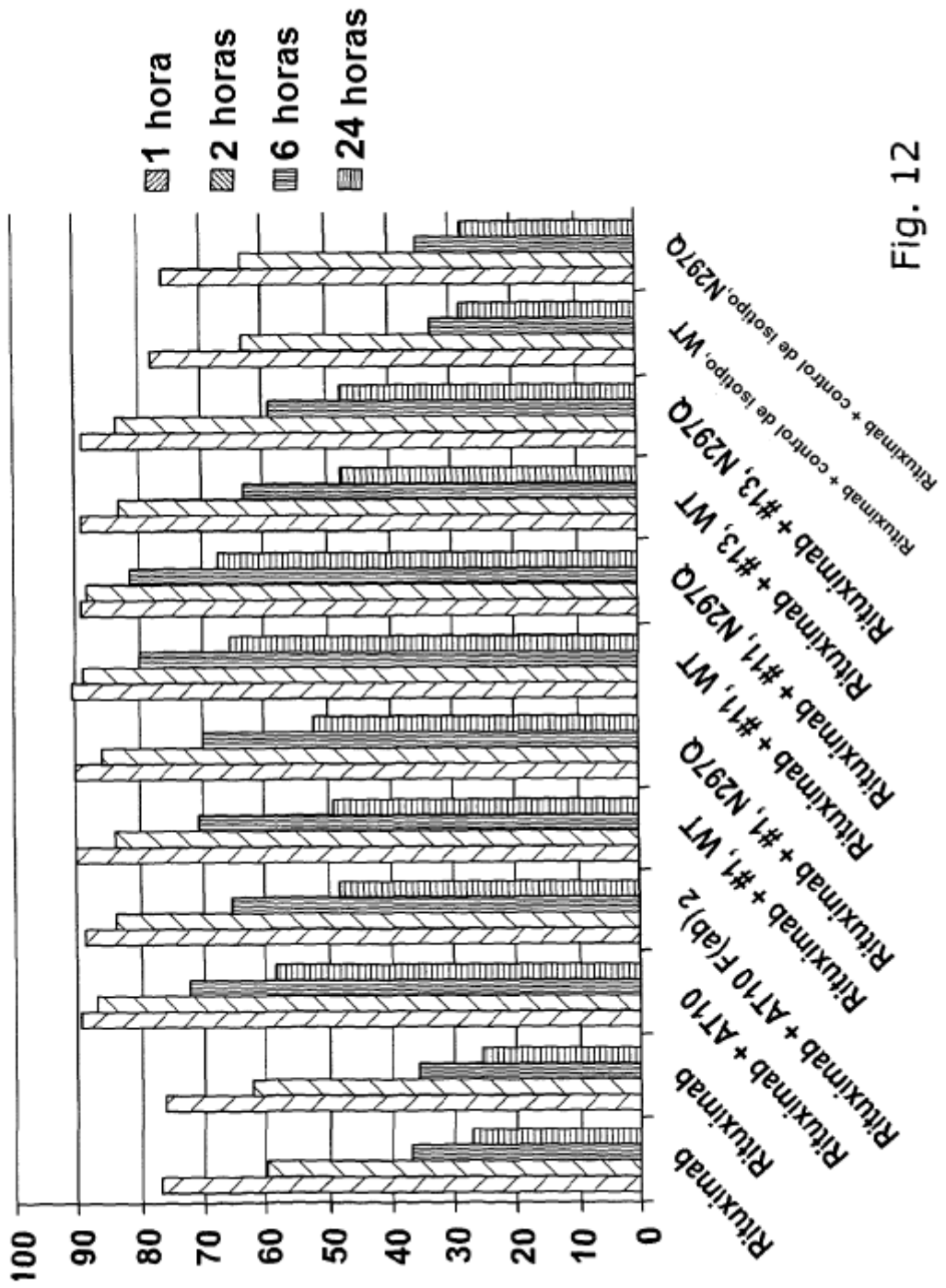


Fig. 12

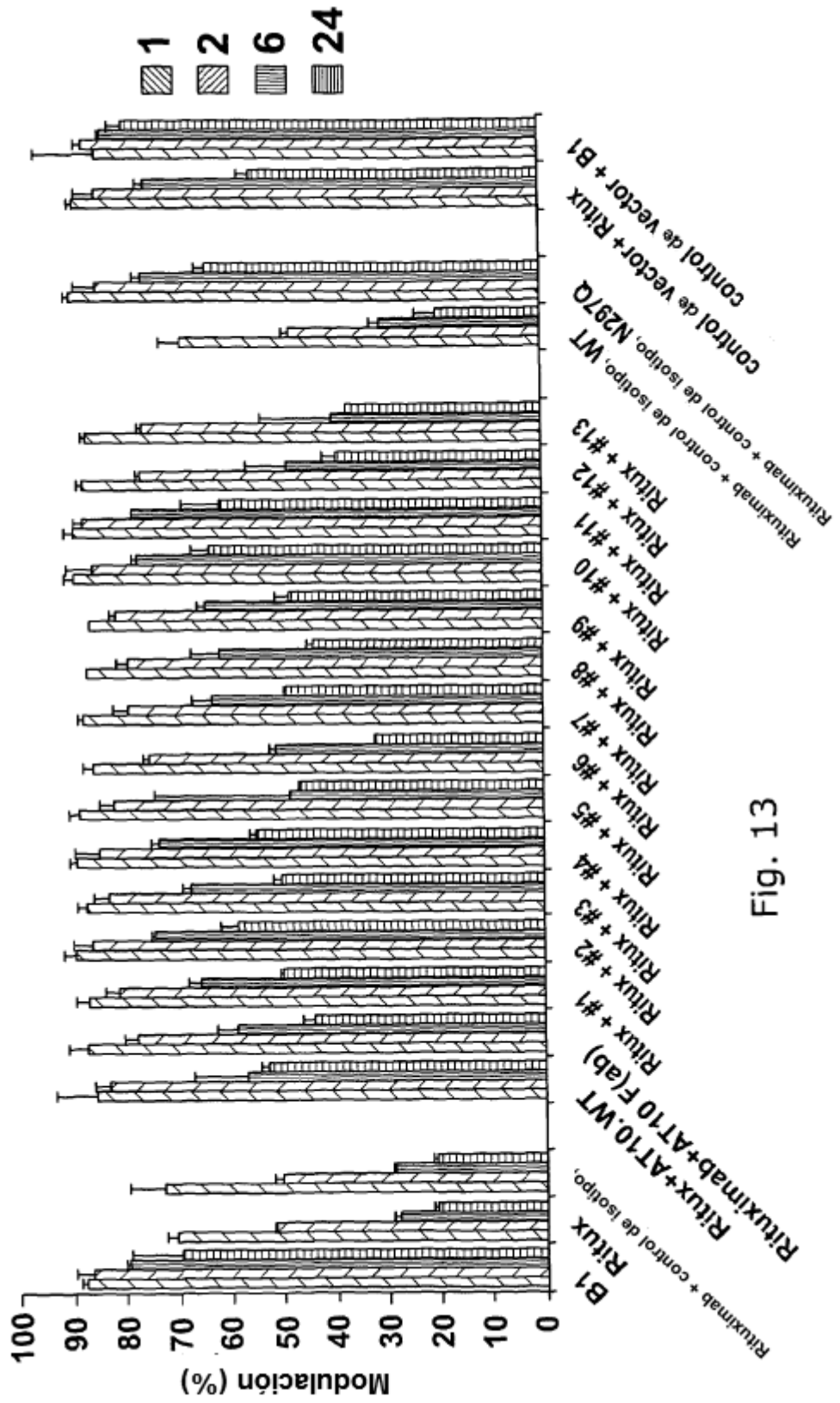
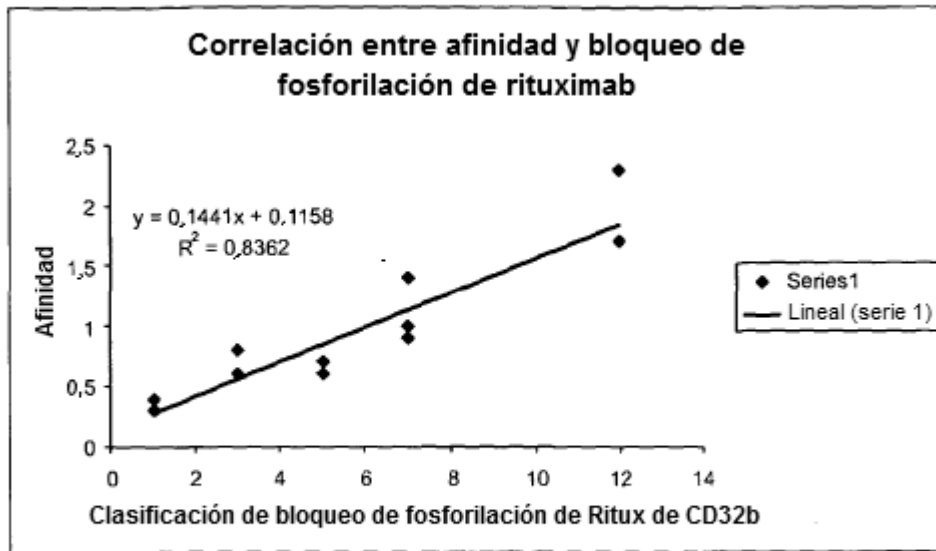


Fig. 13

A



B

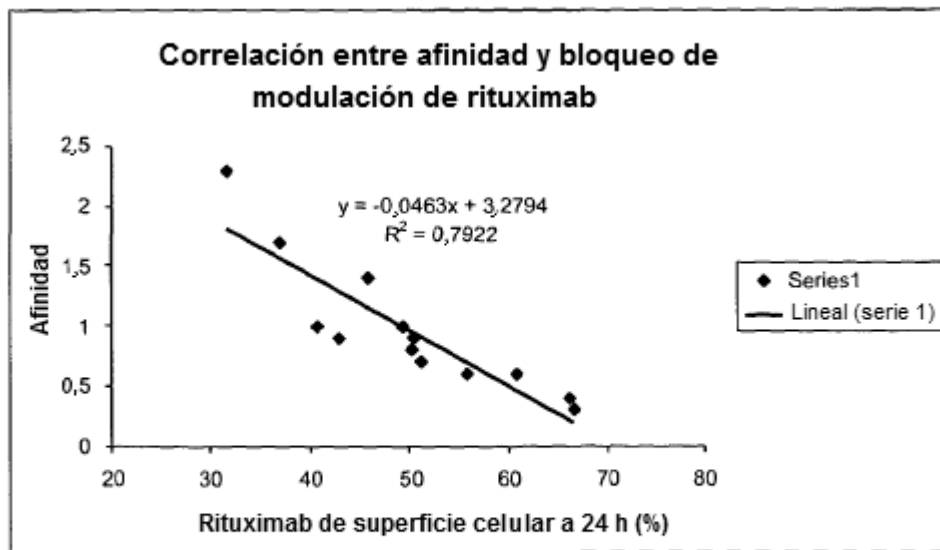


Fig. 14

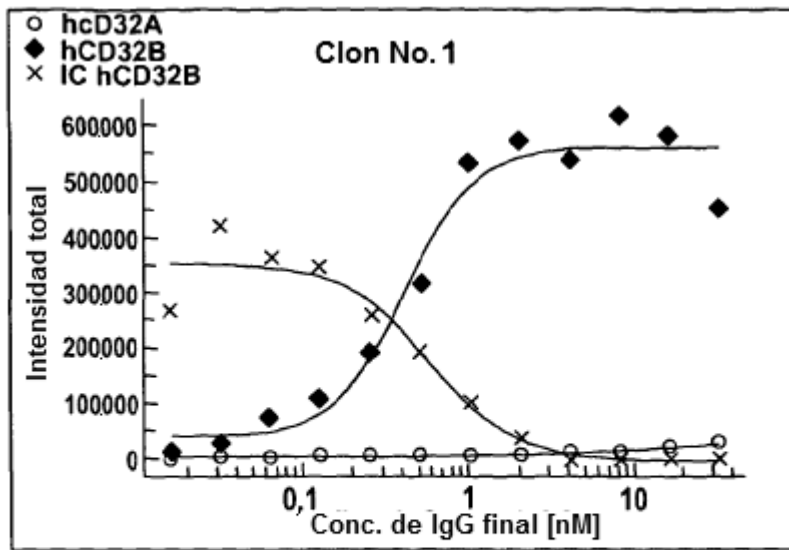


Fig. 15

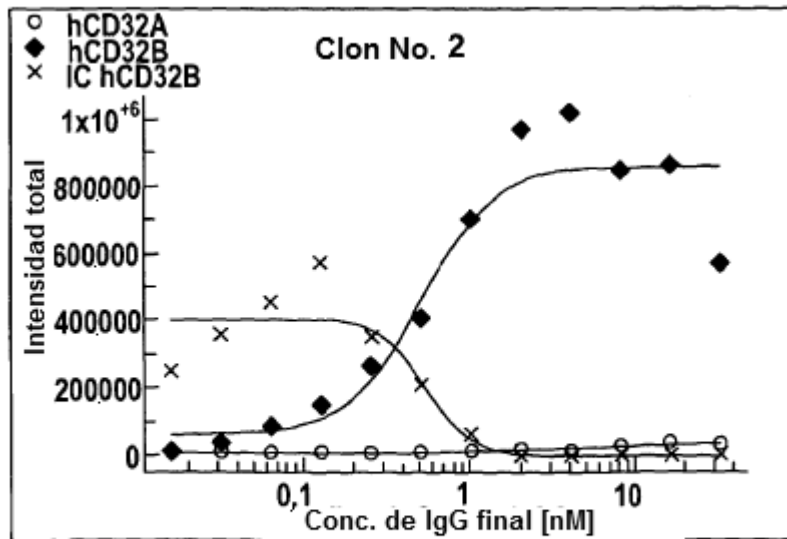


Fig. 16

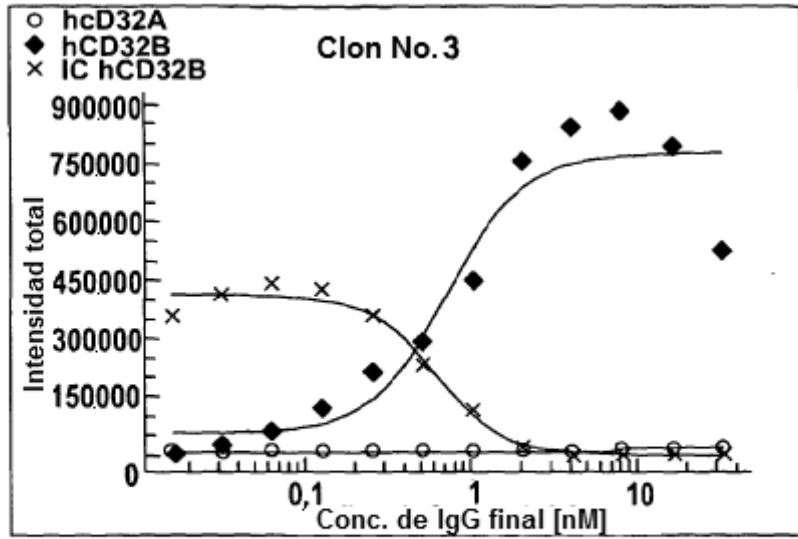


Fig. 17

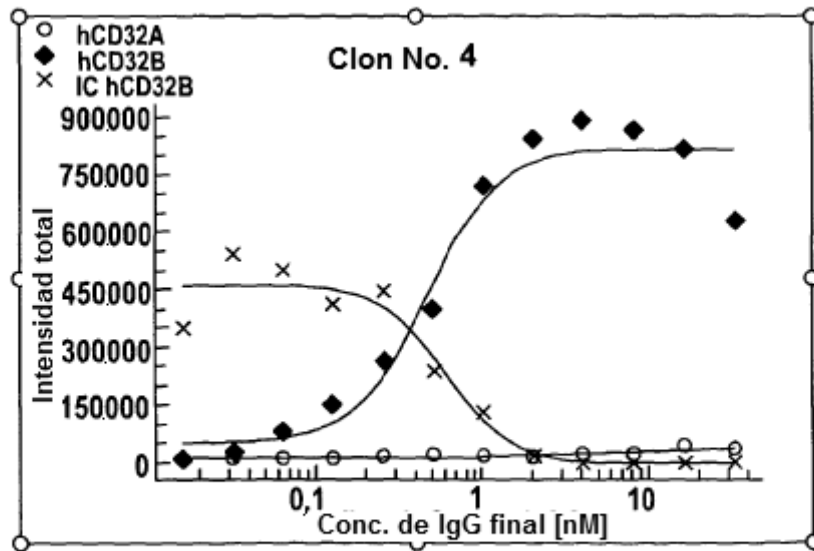


Fig. 18

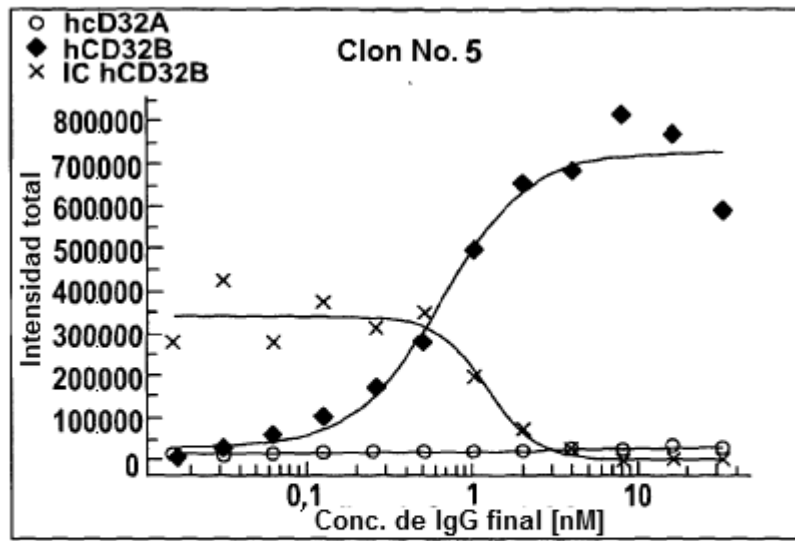


Fig. 19

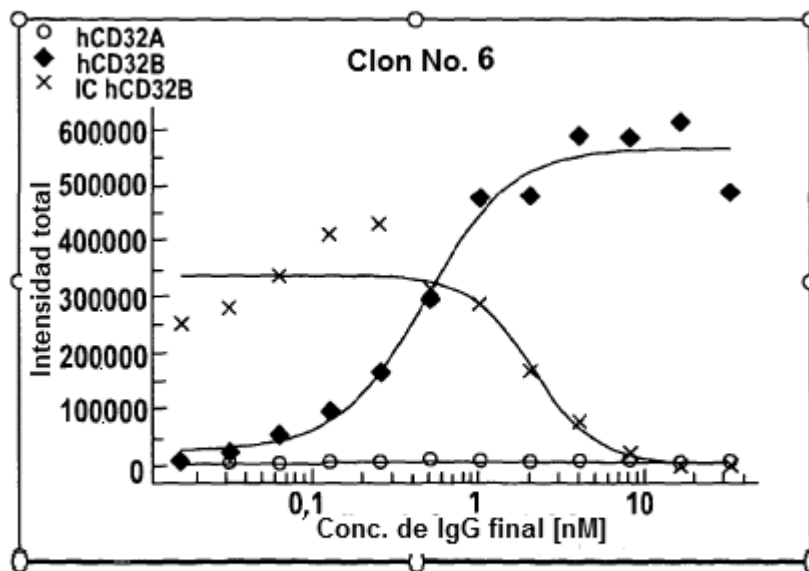


Fig. 20

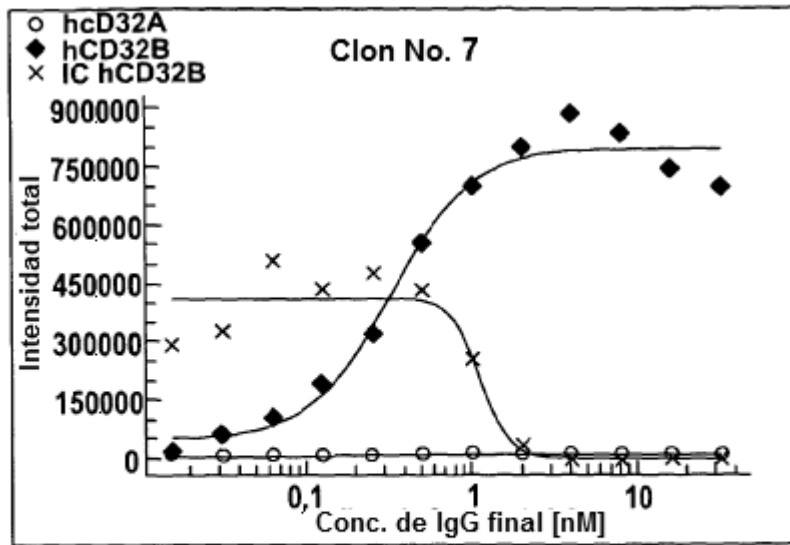


Fig. 21

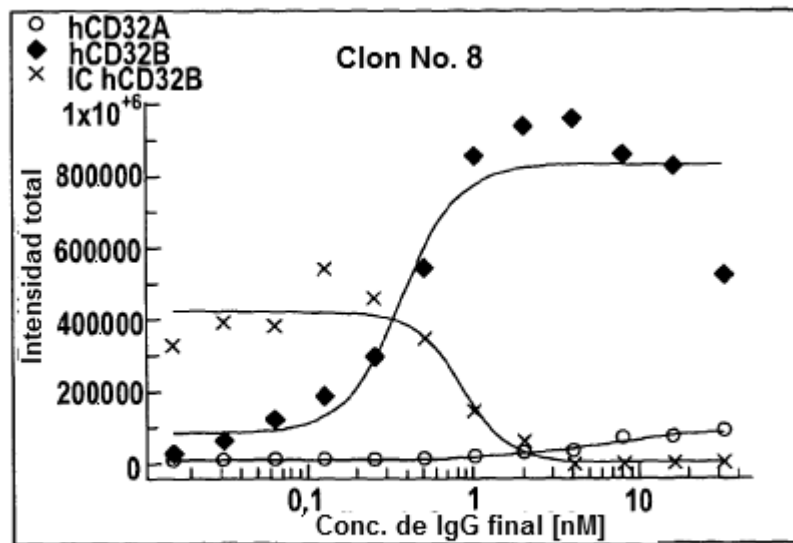


Fig. 22

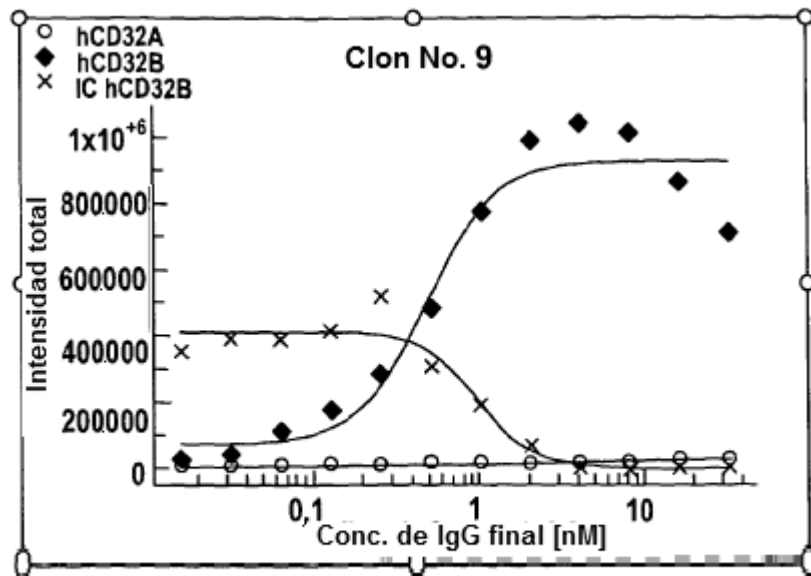


Fig. 23

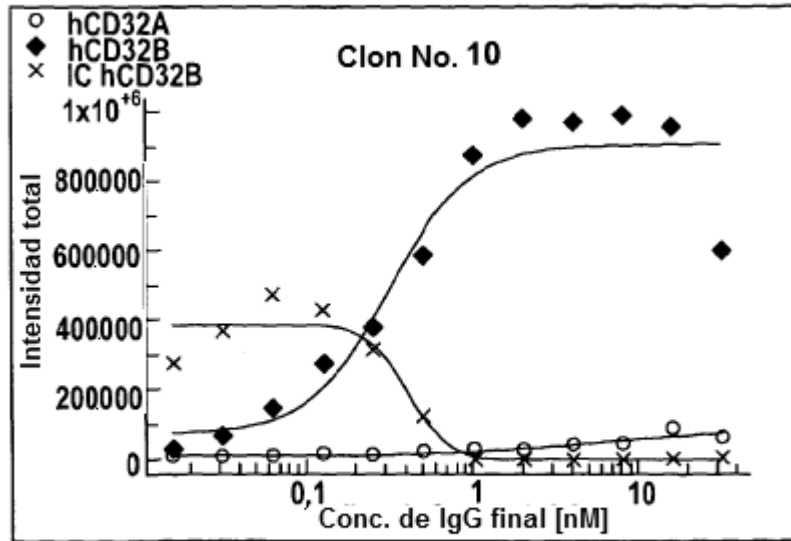


Fig. 24

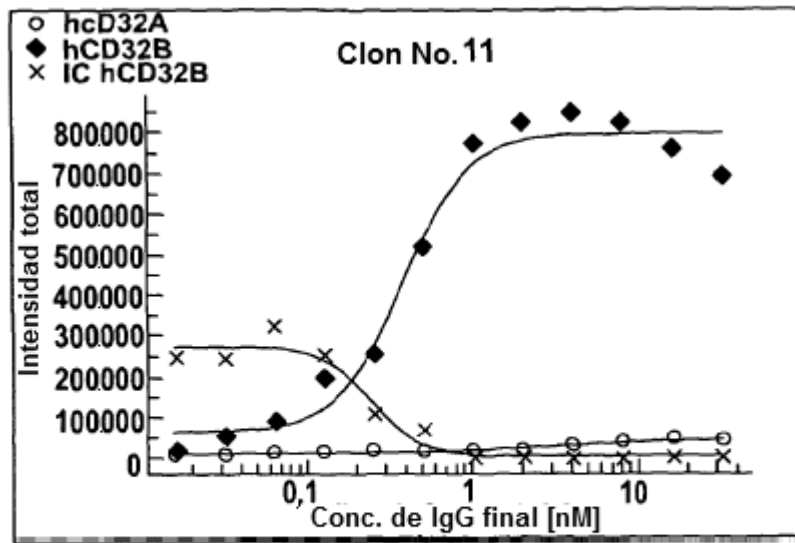


Fig. 25

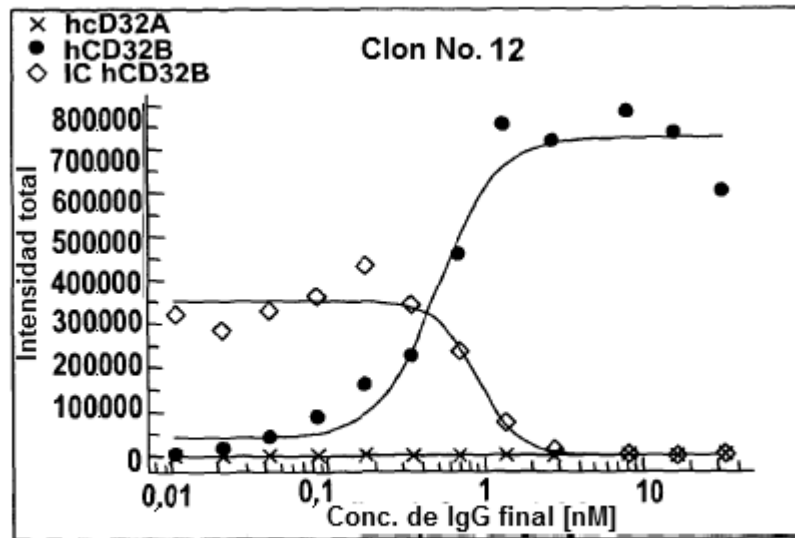


Fig. 26

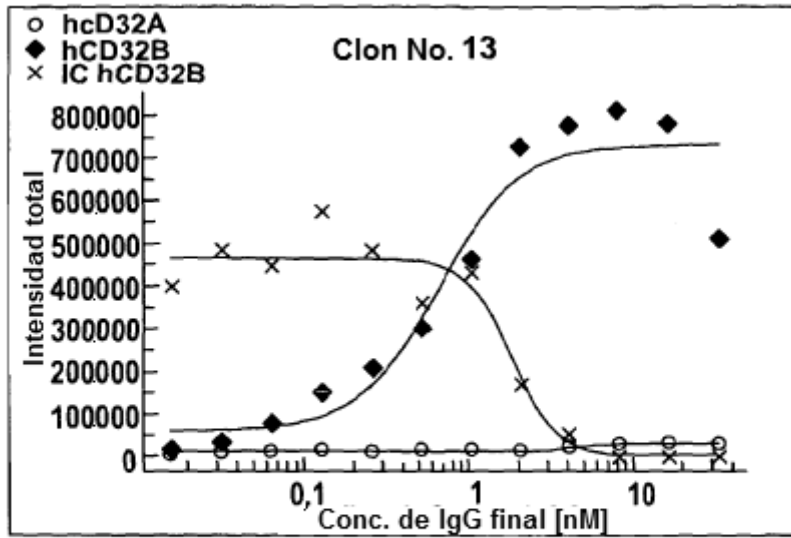


Fig. 27

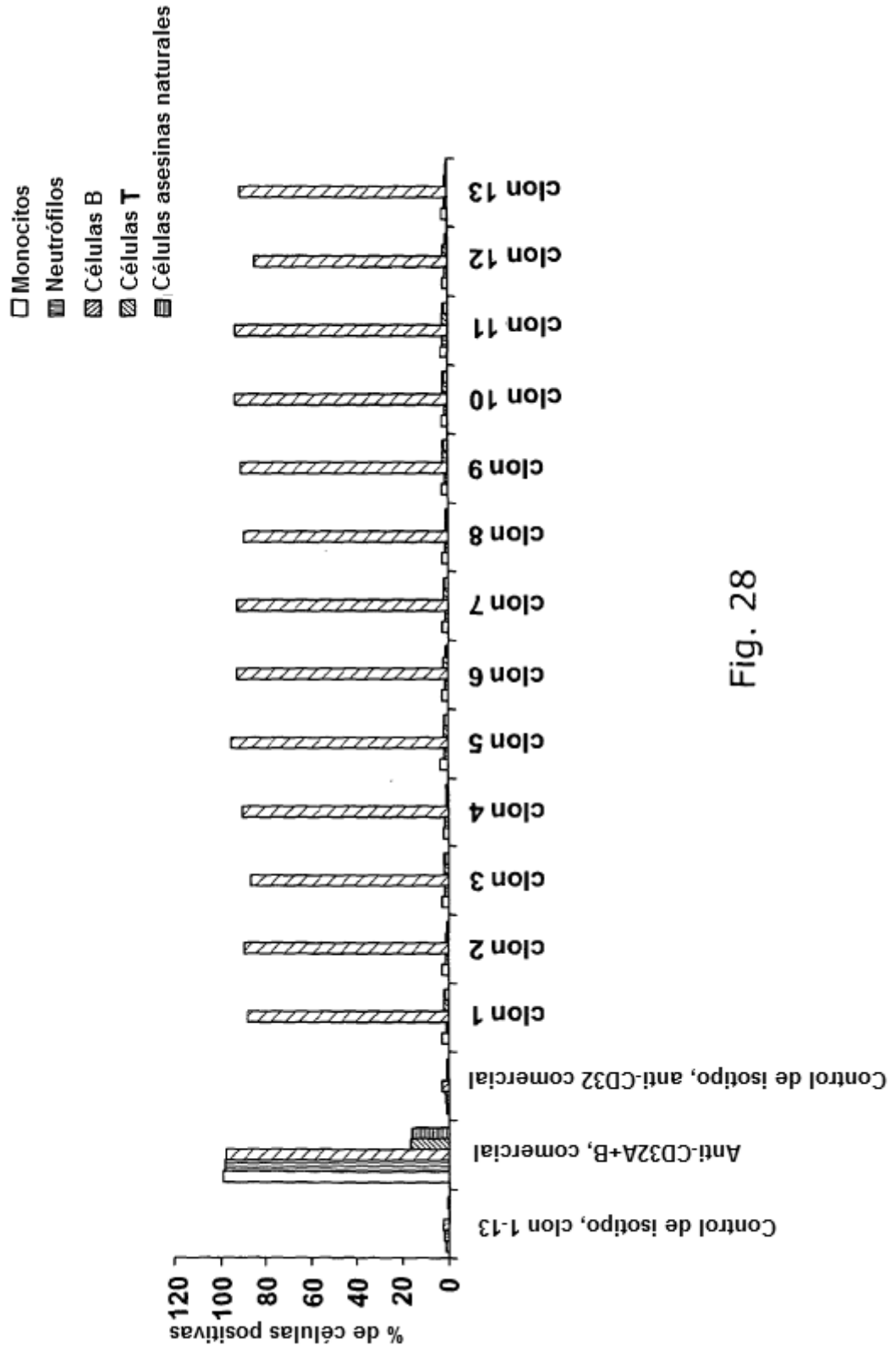


Fig. 28

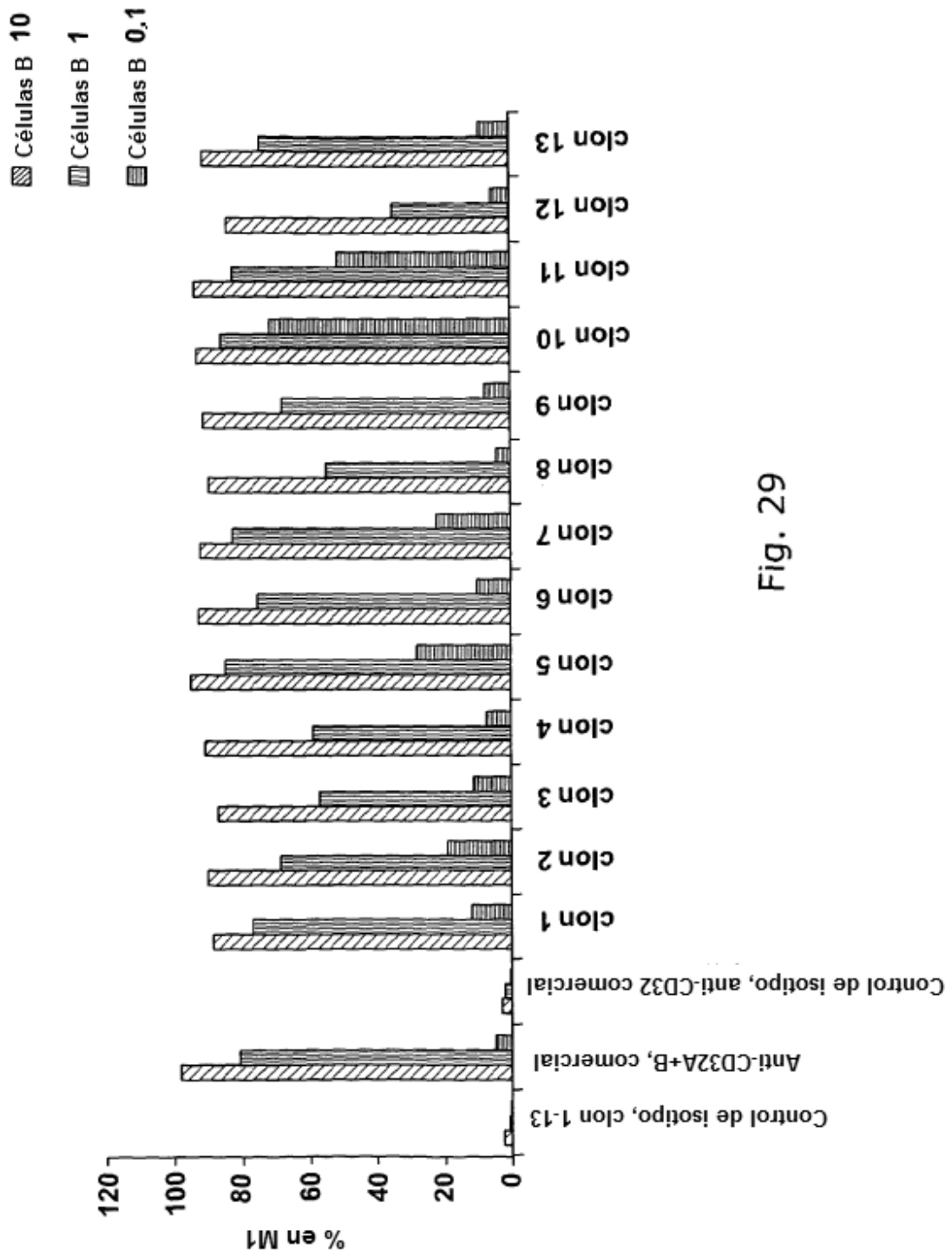


Fig. 29

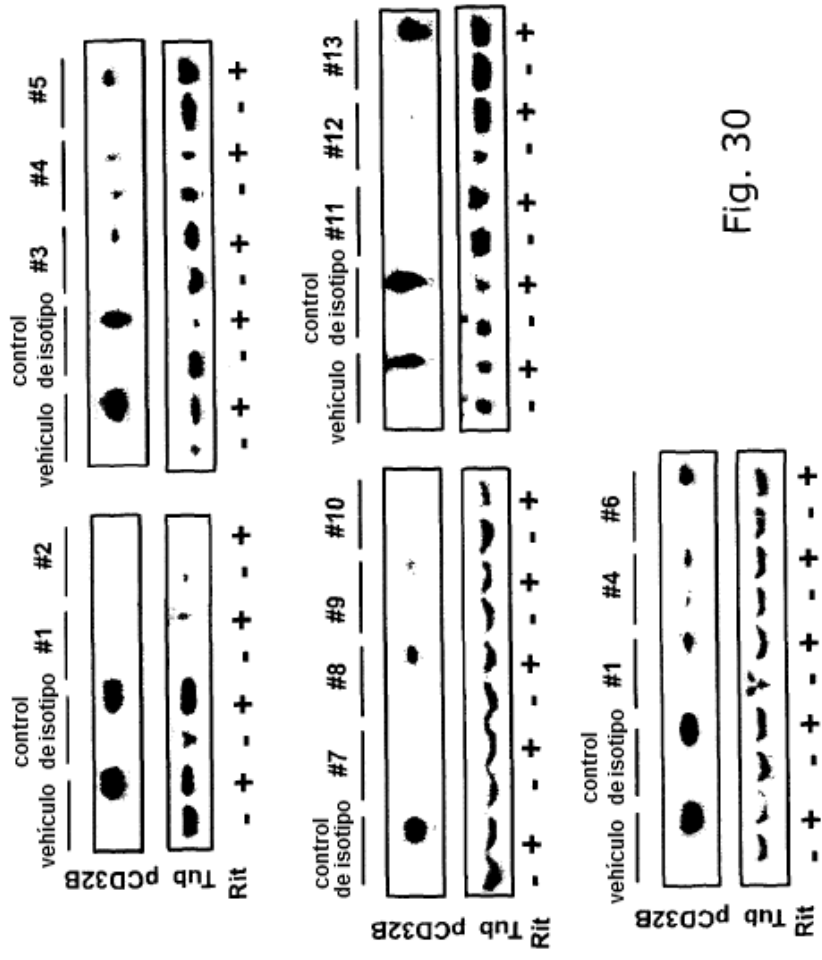


Fig. 30

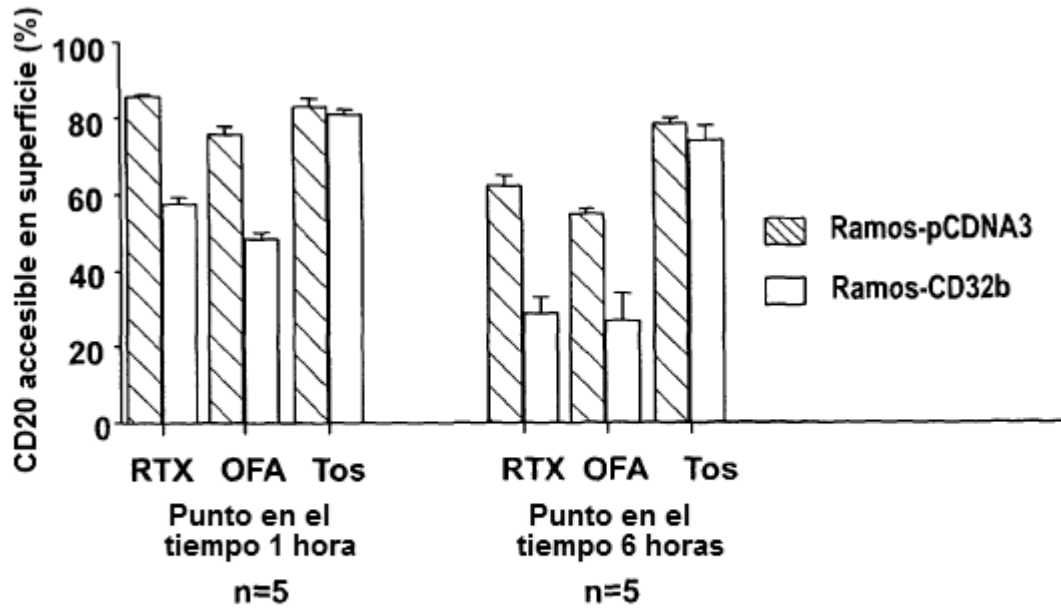


Fig. 31

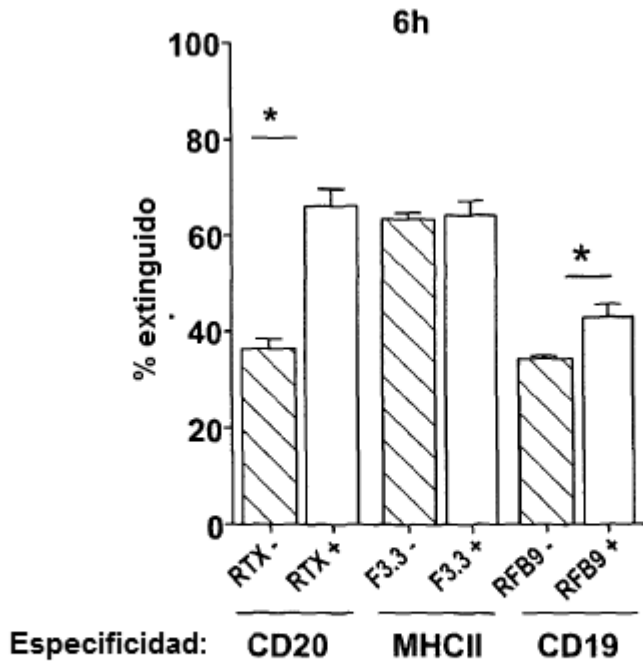


Fig. 32

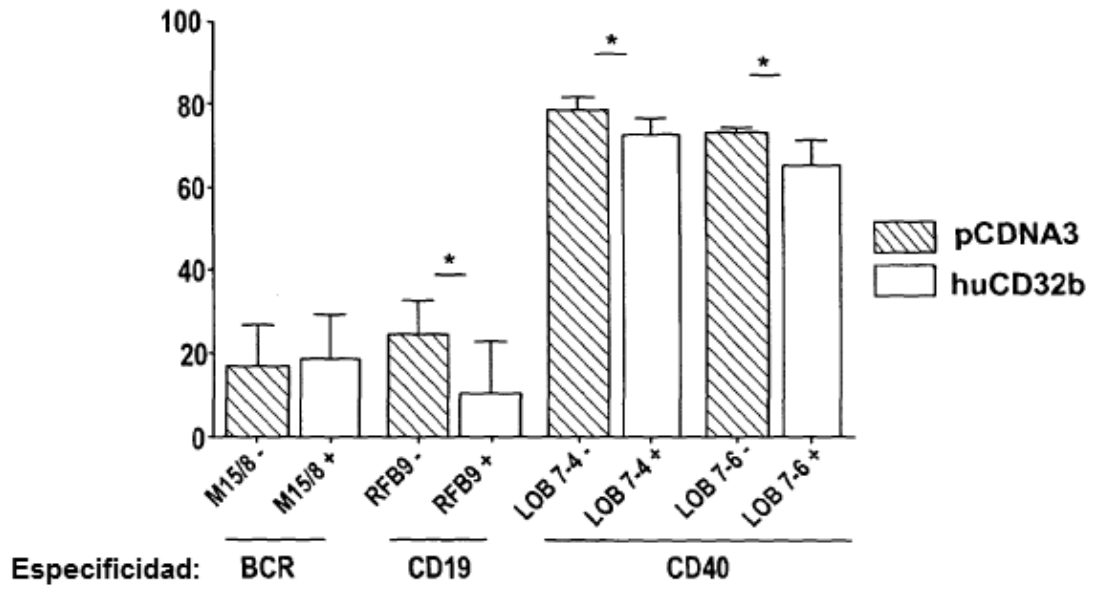


Fig. 33

IgG1-CH [SEQ ID NO: 1]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

λ-CL [SEQ ID NO: 2]

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
ETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Fig. 34

Clon 1

VH [SEQ ID NO: 3]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS **NYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGRF**
FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE**EWRDAFDI**WGQGTLVTVSS
FrH CDRH3 FrH4

-VL [SEQ ID NO: 16]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT**TGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLIY**SDNQRPS**GVPDRFSGSKSG
FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2 FrL3
TSASLAISGLRSEADYYC**AAWDDSLSGSWV**FGGGTKLTVLG
CDRL3 FrL4

Regiones de CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 29]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 30]

CDRH3: EWRDAFDI [SEQ ID NO: 31]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 32]

CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 33]

CDRL3: AAWDDSLSGSWV [SEQ ID NO: 34]

Fig. 35

Clon 2

-VH [SEQ ID NO: 4]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **TYGMH**WVRQAPGKGLEWVA **VIAYDGSKKDYADSVKGR**
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **EYRDAFDI**WGQGTLTVSS

-VL [SEQ ID NO: 17]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT **TGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLIY **GNSNRPS**GVPDRFSGSKSG
TTASLAISGLRSEDEADYYCA **AAWDDSVSGWM**FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: TYGMH [SEQ ID NO: 35]
CDRH2: VIAYDGSKKDYADSVKG [SEQ ID NO: 36]
CDRH3: EYRDAFDI [SEQ ID NO: 37]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 38]
CDRL2: GNSNRPS [SEQ ID NO: 39]
CDRL3: AAWDDSVSGWM [SEQ ID NO: 40]

Fig. 36

Clon 3

-VH [SEQ ID NO: 5]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFM **NYGMH**WVRQAPGKGLEWVA **VISYDGSNRYADSVKGR**
FTMSRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **DRWNGMDV**WGQGTLTVSS

-VL [SEQ ID NO: 18]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS **SGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLIY **ANNQRPS**GVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCA **AAWDDSLNGPWV**FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 41]
CDRH2: VISYDGSNRYADSVKG [SEQ ID NO: 42]
CDRH3: DRWNGMDV [SEQ ID NO: 43]

CDRL1: SGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 44]
CDRL2: ANNQRPS [SEQ ID NO: 45]
CDRL3: AAWDDSLNGPWV [SEQ ID NO: 46]

Fig. 37

Clon 4

-VH [SEQ ID NO: 6]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDTAYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR¹DHSVIGAFDI²WGQGTLTVSS

-VL [SEQ ID NO: 19]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVMWYQQLPGTAPKLLIDNNKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLRSEADYYCSYAGSNNVV³FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 47]
CDRH2: VISYDGSDTAYADSVKG [SEQ ID NO: 48]
CDRH3: DHSVIGAFDI [SEQ ID NO: 49]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVM [SEQ ID NO: 50]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 51]
CDRL3: SSYAGSNNVV [SEQ ID NO: 52]

Fig. 38

Clon 5

-VH [SEQ ID NO: 7]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR⁴DQLGEAFDI⁵WGQGTLTVSS

-VL [SEQ ID NO: 20]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIDNNKRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEADYYCATWDDSLSGPV⁶FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 53]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 54]
CDRH3: DQLGEAFDI [SEQ ID NO: 55]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 56]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 57]
CDRL3: ATWDDSLSGPV [SEQ ID NO: 58]

Fig. 39

Clon 6

-VH [SEQ ID NO: 8]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSSTYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICAGGDIDYFDYWGQGTLVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 21]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: DYGMS [SEQ ID NO: 59]
CDRH2: AISGSGSSTYYADSVKG [SEQ ID NO: 60]
CDRH3: GDIDYFDY [SEQ ID NO: 61]

CDRL1: TGSSSNFGAGYDVH [SEQ ID NO: 62]
CDRL2: ENNKRPS [SEQ ID NO: 63]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 64]

Fig. 40

Clon 7

-VH [SEQ ID NO: 9]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICARERRDAFDI WGQGTLVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 22]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDS DTPVFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 65]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 66]
CDRH3: ERRDAFDI [SEQ ID NO: 67]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 68]
CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 69]
CDRL3: ATWDS DTPV [SEQ ID NO: 70]

Fig. 41

Clon 8

-VH [SEQ ID NO: 10]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARDHSAAGYFDYWGQGLTVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 23]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSIRPSGGPDRFSGSKSGTS
ASLAISGLRSEADYYCAWDDSLSSPVFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 71]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 72]
CDRH3: DHSAGYFDY [SEQ ID NO: 73]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 74]
CDRL2: GNSIRPS [SEQ ID NO: 75]
CDRL3: ASWDDSLSSPV [SEQ ID NO: 76]

Fig. 42

Clon 9

-VH [SEQ ID NO: 11]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSAIIDYAGSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQGLTVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 24]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTDRPSGVPDRFSGSKSGS
TASLAISGLRSEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 77]
CDRH2: GISWDSAIIDYAGSVKG [SEQ ID NO: 78]
CDRH3: DEAAAGAFDI [SEQ ID NO: 79]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 80]
CDRL2: GNTDRPS [SEQ ID NO: 81]
CDRL3: AAWDDSLSGPVV [SEQ ID NO: 82]

Fig. 43

Clon 10

-VH [SEQ ID NO: 12]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGSNKYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELYDAFDIWGQGTLVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 25]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYADHRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYQASWDDSQRAVIFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 83]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 84]
CDRH3: ELYDAFDI [SEQ ID NO: 85]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 86]
CDRL2: ADDHRPS [SEQ ID NO: 87]
CDRL3: ASWDDSQRAVI [SEQ ID NO: 88]

Fig. 44

Clon 11

-VH [SEQ ID NO: 13]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGYIILDYWGQGTLVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 26]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRDYERPSGVPDRFSGSKSGTS
ASLAISGLRSEDEADYYQMAWDDSLSGVVIFGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 89]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 90]
CDRH3: EFGYIILDY [SEQ ID NO: 91]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 92]
CDRL2: RDYERPS [SEQ ID NO: 93]
CDRL3: MAWDDSLSGVV [SEQ ID NO: 94]

Fig. 45

Clon 12

-VH [SEQ ID NO: 14]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NHGMH**WVRQAPGKGLEWVA **VISYDGTNKYYADSVRGR**
FTSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**RETWDAFDV**WGQGLTVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 27]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**SGSSNIGSNNAN**WYQQLPGTAPKLLI**DNNKRPS**GVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLRSEADYY**QAWDSSTVV**FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: NHGMH [SEQ ID NO: 95]
CDRH2: VISYDGTNKYYADSVRG [SEQ ID NO: 96]
CDRH3: ETWDAFDV [SEQ ID NO: 97]

CDRL1: SGSSNIGSNNAN [SEQ ID NO: 98]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 99]
CDRL3: QAWDSSTVV [SEQ ID NO: 100]

Fig. 46

Clon 13

-VH [SEQ ID NO: 15]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTLS****SYGIS**WVRQAPGKGLEWV**SGISGGNTYYADSVKGR**FTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**SVGAYANDAFDI**WGQGLTVTVSS

-VL [SEQ ID NO: 28]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**TGSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLI**GDTNRPS**GVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEADYY**AAWDDSLNGPV**FGGGTKLTVLG

Regiones de CDR

CDRH1: SYGIS [SEQ ID NO: 101]
CDRH2: GISGSGNTYYADSVKGR [SEQ ID NO: 102]
CDRH3: SVGAYANDAFDI [SEQ ID NO: 103]

CDRL1: TGSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 104]
CDRL2: GDTNRPS [SEQ ID NO: 105]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 106]

Fig. 47