

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 517**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2008 PCT/US2008/006915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2008 WO08150494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 08768014 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2176298**

54 Título: **Métodos y composiciones para inhibir células que expresan CD32B**

30 Prioridad:

**30.05.2007 US 940776 P 31.07.2007 US 953174 P**  
**06.09.2007 US 970413 P 28.09.2007 US 976279 P**  
**27.11.2007 US 990509 P 06.12.2007 US 12035 P**  
**14.12.2007 US 13775 P 07.01.2008 US 19395 P**  
**27.02.2008 US 32059 P 09.04.2008 US 43585 P**  
**18.04.2008 US 46397 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.03.2018**

73 Titular/es:

**XENCOR, INC. (100.0%)**  
**111 W. LEMON AVENUE**  
**MONROVIA, CA 91016, US**

72 Inventor/es:

**CHU, SEUNG, YUP;**  
**DESJARLAIS, JOHN, R.;**  
**KARKI, SHER, BAHADUR;**  
**LAZAR, GREGORY, ALAN;**  
**MOORE, GREGORY y**  
**VOSTIAR, IGOR**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 659 517 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**

Métodos y composiciones para inhibir células que expresan CD32B

**Campo técnico**

5 La presente descripción se refiere a métodos para inhibir células que expresan el receptor Fc gamma CD32b (FcγRIIb), a composiciones de inmunoglobulina que pueden ser útiles para dichos métodos, y a la aplicación de dichas composiciones para tratar trastornos inmunes y malignidades hematológicas.

**Antecedentes**

10 El reconocimiento de antígenos por parte de las células B está mediado por el receptor de células B (BCR), una inmunoglobulina ligada superficialmente que forma complejo con los componentes de señalización CD79a (Ig[alfa]) y CD79b (Ig[beta]). El reticulamiento del BCR tras la unión con el antígeno da como resultado la fosforilación de estructuras de activación basadas en tirosina inmunorreceptoras (ITAMs) dentro de CD79a y CD79b, iniciando una cascada de eventos de señalización intracelular que reclutan moléculas subsidiarias a la membrana y estimulan la movilización del calcio. Esto conduce a la inducción de varias respuestas de célula B (p.ej., supervivencia celular, proliferación celular, producción de anticuerpos, presentación de antígenos, diferenciación, etc.) las cuales conducen a una respuesta inmune humoral (DeFranco, A.L., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9, 296-308; Pierce, S. K., 2002, Nat. Rev. Immunol. 2, 96-105; Ravetch, J.V. y Lanier, L. L., 2000, Science 290, 84-89). Otros componentes del complejo de co-receptor BCR potencian (p.ej., CD19, CD21 y CD81) o suprimen (p.ej., CD22 y CD72) la activación de señales de BCR (Doody, G. M. et al., 1996, Curr. Opin. Immunol. 8, 378-382; Li, D. H. et al., 2006, J. Immunol. 176, 5321-5328). De este modo, el sistema inmune mantiene múltiples mecanismos reguladores de BCR para asegurar que las respuestas de célula B están controladas estrechamente.

20 Cuando se producen anticuerpos para un antígeno, el nivel en circulación de los complejos inmunes (p.ej., antígeno ligado a anticuerpo) aumenta. Estos complejos inmunes regulan a la baja la activación de células B inducida por antígeno. Se cree que dichos complejos inmunes regulan a la baja la activación de células B inducida por antígeno co-enfrentando BCR cognado con el receptor inhibitorio de baja afinidad FcγRIIb, el único receptor de IgB en las células B (Heyman, B., 2003, Immunol. Lett. 88, 157-161). También se cree que esta retroalimentación negativa de la producción de anticuerpos requiere la interacción del dominio Fc de anticuerpo con FcγRIIb puesto que los complejos inmunes que contienen fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> no son inhibidores (Chan, P.L. y Sinclair, N. R., 1973, Immunology 24, 289-301). La estructura inhibitoria basada en tirosina de inmunorreceptor intracelular (ITIM) de FcγRIIb es necesaria para inhibir las señales intracelulares inducidas por BCR (Amigorena, S. et al., 1992, Science 256, 1808-1812; Muta, T., et al., 1994, Nature 368, 70-73). Este efecto inhibitorio se produce a través de la fosforilación del ITIM de FcγRIIb, que recluta inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene SH2 (SHIP) para neutralizar la movilización de calcio intracelular inducida por ITAM (Kiener, P. A., et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 3838-3844; Ono, M., et al., 1996, Nature 383, 263-266; Ravetch, J.V. & Lanier, L.L., 2000, Science 290, 84-89). Adicionalmente, la fosforilación de SHIP mediada por FcγRIIb inhibe la ruta de proliferación posterior de Ras-MAPK (Tridandapani, S. et al., 1998, Immunol. 35, 1135- 1 146).

Las patentes WO2006105338 y WO2006019447 describen variantes Fc que presentan una unión mejorada a FcγRIIb.

**Sumario de la descripción**

40 La presente descripción proporciona nuevas inmunoglobulinas, composiciones que comprenden dichas inmunoglobulinas, y métodos para usar la inmunoglobulina para inhibir células que expresan FcγRIIb. Los métodos inhibitorios de células FcγRIIb+ descritos en la presente memoria comprende poner en contacto células FcγRIIb+ con una inmunoglobulina que se une a FcγRIIb y co-enfrenta un antígeno diana sobre la superficie de la célula y un FcγRIIb sobre la superficie de la célula. En una realización, la inmunoglobulina se une a FcγRIIb, en donde la afinidad de dicha unión tiene una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, p.ej., inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región Fc, en donde dicha región comprende una o más modificaciones con respecto a una región Fc original, en donde dichas modificaciones se dan en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En otra realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo bi-específico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une al antígeno diana, y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En otra realización, la inmunoglobulina es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Las células FcγRIIb<sup>+</sup> descritas en la presente memoria pueden ser células cancerosas, células B, células de plasma, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, y una combinación de los mismos.

En la presente memoria también se describen nuevos métodos para inhibir la activación de células B. Los métodos inhibitorios de células B descritos en la presente memoria comprenden poner en contacto células B con una

inmunoglobulina que se une a FcγRIIb y se co-enfrenta a un antígeno diana sobre la superficie de la célula B y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula B. En una realización, la inmunoglobulina se une a FcγRIIb, en donde la afinidad de dicha unión presenta una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, p.ej., inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más modificaciones respecto a una región Fc original, en donde dichas modificaciones se dan en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En otra realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo bi-específico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une al antígeno diana, y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En otra realización, la inmunoglobulina es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En una realización, la inmunoglobulina se une a al menos dos proteínas de célula B, p.ej., al menos dos proteínas ligadas, o que se pueden ligar, a la superficie de células B. En una realización, la primera de dichas proteínas de célula B es FcγRIIb y la segunda de dichas proteínas de célula B es parte del complejo de receptor de célula B (BCR). En otra realización, la segunda de dichas proteínas de célula B no está implicada directamente en el reconocimiento de antígenos. En otra realización, la segunda de dichas proteínas de célula B es un antígeno ligado al complejo BCR. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas inhiben la liberación de calcio de las células B tras su estimulación a través del receptor de célula B. En otra realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria se une a al menos dos proteínas de célula B ligadas a la superficie de la misma célula B.

En la presente memoria también se describen nuevos métodos para tratar trastornos mediados por células B, p.ej., enfermedades autoinmunes, malignidades hematológicas, etc. Los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria comprenden la administración a un paciente que necesite de dicha administración de una cantidad terapéutica de una inmunoglobulina que se une a células FcγRIIB<sup>+</sup> y se co-enfrenta a antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIB sobre la superficie de la célula. En una realización, la inmunoglobulina se une a FcγRIIB, en donde la afinidad de dicha unión presenta una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, p.ej., inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más modificaciones con respecto a una región Fc original, en donde dichas modificaciones se dan en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En otra realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo bi-específico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une al antígeno diana, y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En otra realización, la inmunoglobulina es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En algunas realizaciones, las enfermedades autoinmunes e inflamatorias que pueden ser tratadas mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino, soriasis, diabetes de tipo I y asma.

En la presente memoria se describen nuevas composiciones de inmunoglobulina inhibitoras de células FcγRIIB<sup>+</sup>. Las composiciones descritas en la presente memoria incluyen inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIB<sup>+</sup> y que se co-enfrentan a antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIB sobre la superficie de la célula. En una realización, la inmunoglobulina se une a FcγRIIB, en donde la afinidad de dicha unión presenta una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, p.ej., inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM. En una realización, la inmunoglobulina comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más modificaciones con respecto a una región Fc original, en donde dichas modificaciones se dan en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En otra realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo bi-específico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une al antígeno diana, y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIB con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En otra realización, la inmunoglobulina es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIB con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIB<sup>+</sup> y se co-enfrentan a antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIB sobre la superficie de la célula descritas en la presente memoria pueden unirse y/o co-enfrentarse a un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: CD19, CD20, CD21 (CR2), CD22, CD23 / Fc[epsilon]RII, Fc[epsilon]RI, (subunidades [alfa], [beta] y γ), CD24 / BBA-1 / HSA, CD27, CD35 (CR1), CD38, CD40, CD45RA, CD52 / CAMPATH -1 / HE5, CD72, CD79a (Ig[sigma]), CD79b (Ig[beta]), IgM ([mu]), CD80, CD81, CD86, Leu13, HLA-DR, -DP, -DQ, CD138, CD317 / HM1.24, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD68, CD163, CD172a, CD200R y CD206. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas que se unen a células

FcγRIIb<sup>+</sup> y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula descritas en la presente memoria se pueden unir y/o co-enfrentar a un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: IgM ([μ]), CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD35, CD40, CD45RA, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y HLA-DR. En una realización, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIb<sup>+</sup> y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula descritas en la presente memoria se pueden unir y/o co-enfrentar a un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: IgM ([μ]), CD79a, CD79b, CD19, CD21, CD22, CD72, CD81 y Leu13. En una realización, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIb<sup>+</sup> y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula descritas en la presente memoria se pueden unir y/o co-enfrentar a un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: IgM ([μ]), CD19, CD79a, CD79b, CD81 y HLA-DR. En otra realización, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIb<sup>+</sup> y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula descritas en la presente memoria se pueden unir y/o co-enfrentar a un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: CD22, CD40 y CD72.

En una realización, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIb y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula, descritas en la presente memoria, se unen y/o co-enfrentan a un autoantígeno o alérgeno. En una realización alternativa, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede ser una fusión Fc que está unida covalentemente a un autoantígeno o alérgeno. En una realización, el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en proteínas citrulinadas y péptidos tales como CCP-1, CCP-2 (péptidos citrulinados cíclicos), fibrinógeno, fibrina, vimentina, filagrina, péptidos de colágeno I y II, alfa-enolasa, factor de iniciación de la traducción 4G1, factor perinuclear, queratina, Sa (vimentina de proteína citoesquelética), componentes de cartílago articular tales como colágeno II, IX y XI, proteínas de suero en circulación tales como RFs (IgG, IgM), fibrinógeno, plasminógeno, ferritina, componentes nucleares tales como RA33/hnRNP A2, Sm, factor 1 alfa 1 de elongación de la traducción eucariótica, proteínas de estrés tales como HSP-65, -70, -90, BiP, factores inflamatorios/inmunes tales como B7-H1, IL-1 alfa e IL-8, enzimas tales como calpastatina, alfa-enolasa, aldolasa-A, dipeptidil peptidasa, osteopontina, glucosa-6-fosfato isomerasa, receptores tales como lipocortina 1, proteínas nucleares de neutrófilo tales como lactoferrina y proteína nuclear de 25-35kD, proteínas granulares tales como proteína de incremento de la permeabilidad bactericida (BPI), elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, proteinasa 3, antígenos de plaquetas, antígeno de proteína mielina, antígeno de célula de isleta, factor reumatoide, histonas, proteínas ribosómicas P, cardiolipina, vimentina, ácidos nucleicos tales como dsADN, ssADN y ARN, partículas ribonucleares y proteínas tales como antígenos Sm (que incluyen, aunque sin limitación, SmD's y SmBVB), U1 RNP, A2/B1 hnRNP, Ro (SSA) y antígenos La (SSB).

[1] En una realización, las inmunoglobulinas que se unen a células Fc[γ]RIIb<sup>+</sup> y que se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula, descritas en la presente memoria pueden ser inmunoglobulinas variantes respecto a una inmunoglobulina original. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) están en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) están en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 266, 267, 268, 328, según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc, en donde dicha región Fc comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) están en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice EU [12]. [2] En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en 234F, 234G, 234I, 234K, 234N, 234P, 234Q, 234S, 234V, 234W, 234Y, 234D, 234E, 235A, 235E, 235H, 235I, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T1 236V, 236W, 236Y, 236A, 236E, 236N, 237A, 237E, 237H, 237K, 237L, 237P, 237Q, 237S, 237V, 237Y, 237D, 237N, 239D, 239E, 239N1 239Q, 265E, 266D, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298D, 298E1 298L1 298M, 298Q1 325L, 326A1 326E1 326W, 326D, 327D, 327G, 327L, 327N1 327Q, 327E1 328E, 328F, 328Y1 328H, 328I, 328Q1 328W, 329E, 330D1 330H1 330K1 330S1 331 S, y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en 234N, 234F, 234D,

234E, 234W, 235Q1 235R1 235W1 235Y1 235D, 235F1 235T, 236D1 236H, 2361, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E1 2661, 266M, 267A1 267D1 267E1 267G1 268D, 268E1 268N, 268Q1 298E1 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D1 327D, 327L, 327E, 328E, 328F1 328Y1 328H, 3281, 328Q1 328W, 330D, 330H, 330K, y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en 234D, 234E, 234W1 235D, 235F, 235R1 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M1 267D1 267E1 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en L234E, L235Y, L235R, G236D, G236N, G237N, V266M, S267E, H268E, H268D, A327D, A327E, L328F, L328Y, L328W, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en 235Y1 236D, 239D, 266M, 267E1 268D, 268E, 328F1 328W1 y 328Y, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionada del grupo que consiste en L235Y, G236D, V266M, S267E, H268E, H268D, L328F, L328Y, y L328W, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos modificaciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328, y 328/332, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos modificaciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268, y 267/328, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos modificaciones (p.ej., una combinación de modificaciones) seleccionadas del grupo que consiste en 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 234E/328F, 234W/239D, 234W/239E, 234W/267E, 234W/328Y, 235D/267E, 235D/328F, 235F/239D, 235F/267E, 235F/328Y, 235Y/236D, 235Y/239D, 235Y/267D, 235Y/267E, 235Y/268E, 235Y/328F, 236D/239D, 236D/267E, 236D/268E, 236D/328F, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 239D/268D, 239D/268E, 239D/327D, 239D/328F, 239D/328W, 239D/328Y, 239D/332E, 239E/267E, 266M/267E, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267E/327D, 267E/327E, 267E/328F, 267E/328I, 267E/328Y, 267E/332E, 268D/327D, 268D/328F, 268D/328W, 268D/328Y, 268D/332E, 268E/328F, 268E/328Y, 327D/328Y, 328F/332E, 328W/332E, y 328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dicha(s) modificación(es) dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268 D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dicha(s) modificación(es) dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 236D, 236H, 2361, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 2661, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q,

5 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E.

15 En una realización, dicha(s) modificación(es) da(n) como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E, y 267E/328F, en donde la numeración es según un índice EU.

20 En una realización, las modificaciones descritas en la presente memoria reducen la afinidad con al menos un receptor con respecto a la inmunoglobulina original, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa. En una realización alternativa, las variantes de inmunoglobulina descritas en la presente memoria median en ADCC o ADCP reducidas con respecto a la inmunoglobulina original.

En la presente memoria también se describen métodos para diseñar las nuevas composiciones de inmunoglobulina.

25 En la presente memoria también se describen métodos para realizar un escrutinio de antígenos diana en función de su capacidad para mediar en la inhibición celular a través de un mecanismo dependiente de FcγRIIb. En una realización, los métodos de escrutinio de antígenos descritos en la presente memoria comprenden la etapa de unirse a una célula que expresa el antígeno diana y FcγRIIb con una inmunoglobulina que se une con una afinidad mejorada, p.ej., la Kd de la inmunoglobulina puede ser inferior a aproximadamente 100 nM con al menos FcγRIIb. En otra realización, la unión simultánea tanto del antígeno diana como de FcγRIIb a la inmunoglobulina da como resultado una respuesta celular inhibitoria. En una realización de los métodos de escrutinio descritos en la presente memoria, la célula se selecciona del grupo que consiste en: células B, células de plasma, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos. En otros métodos diversos de escrutinio descritos en la presente memoria, la inmunoglobulina puede ser específica para un antígeno diana. En una realización alternativa, la inmunoglobulina es específica para un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo es específico para el antígeno diana. En una realización alternativa, la inmunoglobulina es específica para un hapteno, y en donde el antígeno diana, o un anticuerpo o proteína que es específico para el antígeno diana, está haptenizado.

35 En la presente memoria también se describen ácidos nucleicos aislados que codifican las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. En la presente memoria también se describen vectores que comprenden los ácidos nucleicos, opcionalmente, ligados operativamente a secuencias de control. En la presente memoria también se describen células hospedantes que contienen los vectores, y métodos para producir y opcionalmente recuperar las composiciones de inmunoglobulina.

40 En la presente memoria también se describen polipéptidos de inmunoglobulina, que comprenden las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Los polipéptidos de inmunoglobulina pueden usarse en un producto terapéutico. En una realización, los polipéptidos de inmunoglobulina descritos en la presente memoria pueden ser anticuerpos.

45 En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden polipéptidos de inmunoglobulina descritos en la presente memoria, y un vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

50 En la presente memoria también se describen usos terapéuticos y diagnósticos para los polipéptidos de inmunoglobulina descritos en la presente memoria. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se usan para tratar una o más enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. En una realización alternativa, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se usan para tratar una o más malignidades hematológicas.

### Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácido de las inmunoglobulinas IgG humanas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La Figura 1A proporciona las secuencias de los dominios CH1 (Cγ1) y de bisagra, y la Figura 1B proporciona las secuencias de los dominios CH2 (Cγ2) y CH3 (Cγ3). Las posiciones están numeradas según el índice EU de la secuencia IgG1, y las diferencias entre la IgG1 y las otras inmunoglobulinas IgG2, IgG3 e IgG4 se muestran en gris. Existen polimorfismos alotípicos en una serie de posiciones, y por tanto pueden existir pequeñas diferencias entre las secuencias presentadas y la técnica anterior. Los comienzos posibles de la región Fc están marcados, definidos en la presente memoria como la posición EU 226 ó 230.

Figura 2. Haplotipos comunes de las cadenas gamma1 (Figura 2A) y gamma2 (Figura 2B) humanas.

Figura 3. Nuevos métodos para inhibir la activación de célula B. Aquí CR representa un co-receptor del complejo BCR, pero podría ser cualquier antígeno expresado sobre cualquier célula FcγRIIb<sup>+</sup>.

5 Figura 4. Posiciones FcγR que contribuyen a la selectividad de unión de FcγRIIb y FcγRIIIa. Las posiciones se identificaron evaluando la proximidad a la interfaz FcγR/Fc y la disimilitud de aminoácidos entre FcγRIIb y FcγRIIIa.

Figura 5. Posiciones Fc proximales a posiciones FcγR que contribuyen a la selectividad de unión de FcγRIIb y FcγRIIIa, tal como se enumera en la Figura 6.

Figura 6. Sensogramas de resonancia de plasmón superficial Biacore que muestran la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes de Fc a FcγRIIb humano.

10 Figura 7. Afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs humanos, determinadas mediante resonancia de plasmón superficial Biacore. La tabla presenta la constante de disociación (Kd) para la unión de anticuerpos variantes anti-CD19 con FcγRI, FcγRIIa (131 R), FcγRIIa (131 H), FcγRIIb, FcγRIIIa (158V), y FcγRIIIa (158F) humanos. Se han promediado múltiples observaciones, n.d. = unión no detectable.

15 Figura 8. Incremento de afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs humanos determinado mediante resonancia de plasmón superficial Biacore. La tabla presenta la tasa de mejora o de reducción en la afinidad con respecto a IgG1 WT para la unión de anticuerpos variantes anti-CD19 FcγRI, FcγRIIa (131 R), FcγRIIa (131 H), FcγRIIb, FcγRIIIa (158V), y FcγRIIIa (158F) humanos. Tasa = KD(IgG1 nativa)/KD(variante). n.d. = unión no detectable.

20 Figura 9. Afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs humanos determinadas mediante resonancia de plasmón superficial Biacore. La gráfica muestra el -log(KD) correspondiente a la unión de anticuerpos variantes anti-CD19 e IgG1 WT con FcγRI (I), R131 FcγRIIa (RIIa), H131 FcγRIIa (HIIa), FcγRIIb (Mb), y V158 FcγRIIIa (Villa) humanos. La unión de L235Y/S267E, G236D/S267E, y S267E/L328F a V158 FcγRIIIa no fue detectable.

25 Figura 10. Afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs humanos determinadas mediante resonancia de plasmón superficial Biacore. La gráfica muestra el -log(KD) correspondiente a la unión de anticuerpos variantes anti-CD19 e IgG1 WT con FcγRI (I), R131 FcγRIIa (RIIa), H131 FcγRIIa (HIIa), FcγRIIb (Mb), y V158 FcγRIIIa (Villa) humanos.

30 Figura 11. Análisis de variantes de combinación (dobles, triples) para determinar efectos sinérgicos y no aditivos en la unión a FcγRIIb (A), FcγRI (B), R131 FcγRIIa (C), H131 FcγRIIa (D), y V158 FcγRIIIa (E) humanos. Se representa la ratio entre la tasa de mejora real medida mediante SPR y la tasa de mejora esperada calculada multiplicando las tasas de mejora de las variantes de sustitución individual. Los ratios mayores a uno indican un efecto sinérgico.

Figura 12. Unión de anticuerpos variantes de Fc a FcγRs humanos respecto a IgG1 WT medida mediante unión de superficie celular. Los anticuerpos (variante e IgG1 WT) se añadieron a células HEK293T transfectadas con FcγRIIb para establecer la unión de superficie celular. Las curvas de unión fueron construidas representando MFI en función de la concentración de variante de Fc.

35 Figura 13. Afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs de mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) determinadas mediante resonancia de plasmón superficial Biacore, bien mediante constante de disociación (Kd) o determinación de valor de corte, según se indique. La tabla enumera la tasa de mejora respecto a IgG1 WT para la unión de variantes de anticuerpo anti-CD19 a FcγRI de ratón, FcγRII de ratón, FcγRIII de ratón, FcγRIV de ratón, FcγRI de mono cynomolgus, FcγRIIa de mono cynomolgus, FcγRIIb de mono cynomolgus, y FcγRIIIa de mono cynomolgus. NB = unión no detectable.

40 Figura 14. Afinidades de anticuerpos variantes de Fc por FcγRs humanos determinadas mediante resonancia de plasmón superficial Biacore. El gráfico muestra el -log(KD) de la unión de anticuerpos variantes anti-CD19 y anticuerpos IgG1 WT a FcγRI (I), R131 FcγRIIa (RIIa), H131 FcγRIIa (HIIa), FcγRIIb (Mb), y V158 FcγRIIIa (Villa) humanos.

45 Figura 15. Ensayo de viabilidad de células B dependiente de ATP que demuestra la supervivencia de células B humanas primarias tras activación de BCR, llevada a cabo aquí mediante reticulamiento con anticuerpos anti-μ (A) o anti-CD79b (B).

50 Figura 16. Inhibición de la proliferación de células B mediante anticuerpos anti-CD19 variantes de Fc. Se usa S267E/L328F anti-RSV (virus sincitial respiratorio) como control (el RSV no es expresado en células B). Se usó un ensayo de luminiscencia dependiente de ATP para medir la proliferación de células B en presencia de 10 μg/mL de anticuerpo activador anti-CD79b, y se comparó el efecto del anti-CD19-S267E/L328F con anti-CD19-IgG1 (control nativo de Fv de IgG1 Fv) y anti-RSV-S267E/L328F (control Fc no CD19). Para determinar la importancia del co-enfrentamiento a CD19 y FcγRIIb, se usó anti-RSV-S267E/L328F solo o en combinación con anti-CD19-IgG1.

Figura 17. Inhibición de la proliferación de células B mediante anticuerpos anti-CD19 variantes de Fc. Se usó un ensayo de luminiscencia dependiente de ATP para medir la proliferación de células B humanas en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo activante anti-CD79b, y concentraciones variables de los anticuerpos de control anti-CD19 o anti-RSV.

- 5 Figura 18. Inhibición de la proliferación de células B por anticuerpos anti-CD19 variantes de Fc. Se usó un ensayo de luminiscencia dependiente de ATP para medir la proliferación de células B humanas en presencia de 2 µg/mL de anticuerpo anti-[mu] (mu) y concentraciones variables de los anticuerpos anti-CD19 indicados.

- 10 Figura 19. El co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 por las variantes de HbE inhibe la movilización de calcio inducida por activación de BCR en células B humanas primarias. La movilización de calcio fue inducida con 10 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b activante de BCR. La movilización de calcio se midió en presencia de 10 µg/mL de concentración fija de las variantes MbE anti-cD19, cc-CD19-IgG1 (control de Fv de IgG1 nativa), [alfa]-FITC-S267E/L328F (control de Fc no CD19), o vehículo PBS. Los datos se representan como el cambio de MFI con el tiempo, o el área bajo la curva de respuesta normalizada a la máxima intensidad de señal medida.

- 15 Figura 20. El co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 por las variantes de MbE inhibe la movilización de calcio inducida por activación de BCR en células B humanas primarias. La movilización de calcio fue inducida con 10 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b activante de BCR. La movilización de calcio se midió a múltiples concentraciones de anticuerpo para anti-CD19-IgG1 y tres variantes de MbE, y se representaron las áreas bajo las curvas para obtener relaciones dosis-respuesta.

- 20 Figura 21. Correlación entre la afinidad por FcγRIIb y la inhibición de la liberación de calcio. Los datos de EC50 proceden de la Figura 20, y los símbolos son los mismos indicados en la Figura 22. Las afinidades son de los datos de Biacore presentados en la Figura 7.

- 25 Figura 22. El co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 por las variantes de MbE inhibe la movilización de calcio inducida por activación de BCR en células B humanas primarias. La movilización de calcio fue inducida con 10 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b activante de BCR. FcγRI soluble (50 µg/mL) añadido a 10 µg/mL de [alfa]-CD19-S267E/L328F eliminó completamente el efecto inhibitorio de la variante de MbE sobre la movilización de calcio, confirmando la importancia del enfrentamiento a FcγRIIb por parte del anticuerpo anti-CD19.

- 30 Figura 23. La variante MbE anti-CD19-S267E/L328F activa la fosforilación SHIP mediada por FcγRIIb en células B humanas primarias. Se añadió anti-CD 19-S267E/L328F, anti-CD19-IgG1 (control de Fv), anti-RSV-S267E/L328F (control de Fc), anti-CD19-Fc KO (control de Fv), o anti-FcγRII (10 µg/mL de cada uno) a células B en presencia de 20 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b. Como control positivo, se usaron 20 µg/mL de fragmento F(ab')<sub>2</sub> de IgG anti-ratón de cabra para reticular los anticuerpos anti-CD79b y anti-FcγRII. Se sondeó una mancha de extractos celulares totales con anti-pSHIP, usando anti-GAPDH como control de carga. En relación a los controles negativos, anti-CD19-S267E/L328F indujo una mayor fosforilación SHIP1 que el reticulamiento directo de BCR y FcγRIIb por anticuerpos CD79b y FcγRIIb.

- 35 Figura 24. Anti-CD19-S267E/L328F inhibe los efectos apoptóticos de la activación de BCR sobre células B humanas primarias. La inhibición de las señales de supervivencia mediadas por BCR por el co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 fue examinada usando tinción con anexina-V en presencia de 10 µg/mL de anti-CD79b. La apoptosis de células B se vio estimulada por anti-CD19-S267E/L328F, pero no por anti-CD19-IgG1 (control de Fv), por anti-RSV-S267E/L328F (control de Fc), o por los dos controles combinados.

- 40 Figura 25. Actividad ADCC mediada por células NK de anticuerpos variantes de Fc contra células B Ramos.

Figura 26. Fagocitosis mediada por macrófagos (ADCP) de anticuerpos variantes de Fc contra células B RS4; 11.

Figura 27. Los anticuerpos anti-CD19 variantes de Fc no median en la actividad CDC contra células B Raji.

- 45 Figura 28. Evaluación de la capacidad del co-enfrentamiento de CD19 y FcγRIIb para inhibir la activación de células B humanas in vivo. (A) Representación esquemática del protocolo experimental. (B) Título de anticuerpos específicos de toxoide antitetánico (TT) en ratones huPBL-SCID tras inmunización TT y tratamiento con vehículo (PBS), IgG1 anti-CD19 WT, anti-CD19 con afinidad por FcγRIIb mejorada (a-CD19 S267E/L328F), o anti-CD20 (Rituximab).

- 50 Figura 29. Antígenos diana que pueden ser co-dianas de FcγRIIb efectivas para la modulación de la actividad celular. B = células B, Plasma = células de plasma, DC = células dendríticas, M[Phi] = macrófagos, PMN = neutrófilos, Baso = basófilos, Eos = eosinófilos, y Mast = mastocitos.

Figura 30. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b-SN8-G236R/L328R, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o variante FcγR bloqueada (G236R/L328R o <[Lambda]>236R/L328R) versiones de anticuerpos anti-CD20 (clon PRO70769), -CD52 (Campath) y -CD19 (HuAM4G7).

- Figura 31. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de anticuerpo anti-[mu], y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R) o de las versiones de IgG1 WT de anticuerpos anti-CD23 (clon 5E8 o C11).
- 5 Figura 32. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de anticuerpo anti-[mu], y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R) o de las versiones de IgG1 WT del anticuerpo anti-CD79b SN8.
- Figura 33. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de anticuerpo anti-[mu], y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R) o de las versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-CD22.
- 10 Figura 34. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de estimulación de BCR mediante (A) 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b-SN8-G236R/L328R o (B) 2 µg/mL de anticuerpo anti-[mu], y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpos anti-CD40 (clones PFC40, S2C6, G28.5 y 5D12).
- 15 Figura 35. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b-SN8-G236R/L328R, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R o <[Lambda]>236R/L328R) versiones de anticuerpos anti-CD19 (clones HD37, 21D4 o HuAM4G7).
- 20 Figura 36. Ensayo de liberación de calcio que mide la capacidad de inhibición de anticuerpos variantes con especificidad por CD22 (A), CD23 (B), CD40 (C) y CD79b (D). La movilización de calcio se indujo con 10 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b-SN8-G236R/L328R, y se monitorizó en presencia de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R) versiones de anticuerpos anti-CD22, -CD23, -CD40 y CD79b.
- 25 Figura 37. Estrategia de hapteno para realizar el escrutinio de antígenos diana en función de su capacidad para modular la actividad celular tras un co-ataque de alta afinidad con FcγRIIb.
- Figura 38. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[mu] FITCilado y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (G236R/L328R o <[Lambda]>236R/L328R), o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC (clon 4-4-20). Se incluyó anti-RSV como control.
- 30 Figura 39. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[mu], 0,5 µg/mL de anti-CD19 marcado con FITC (clon de IgG1 de ratón 4G7), y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (<[Lambda]>236R/L328R), o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC.
- 35 Figura 40. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[mu], 0,5 µg/mL de clon anti-CD20 marcado con FITC PDR-79 (A) o 1 µg/mL de Rituxan marcado con FITC (B), y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de variante FcγR bloqueada (<[Lambda]>236R/L328R), o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC. También se incluyó anti-mu marcado con FITC a una concentración de 2 µg/mL en (B) como control.
- 40 Figura 41. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), 0,5 µg/mL de anti-CD21 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC.
- Figura 42. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), 0,5 µg/mL de anti-CD24 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC.
- 45 Figura 43. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[mu], 0,25 µg/mL de anti-CD1 marcado con FITC o 0,5 µg/mL de anti-CD24 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC.
- 50 Figura 44. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), anti-CD35 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de anticuerpo anti-FITC con FcγR bloqueado (G236R/L328R).

Figura 45. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), anti-CD45RA marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de anticuerpo anti-FITC con FcγR bloqueado (G236R/L328R).

5 Figura 46. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), anti-CD72 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de anticuerpo anti-FITC con FcγR bloqueado (G236R/L328R).

10 Figura 47. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[µ], 2 µg/mL de anti-CD79a marcado con FITC (clon ZL7-4), y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC con FcγR bloqueado (<[Lambda]>236R/L328R).

Figura 48. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 2 µg/mL de F(ab')<sub>2</sub> anti-[µ], 1,8 µg/mL de anti-CD79b marcado con FITC (clon ZL9-3), y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), de FcγR bloqueado (<[Lambda]>236R/L328R) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC.

15 Figura 49. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b (SN8), anti-CD80 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o de versiones con FcγR bloqueado (G236R/L328R) de anticuerpo anti-FITC.

20 Figura 50. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de anti-CD81 marcado con FITC, concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F), variante de FcγR bloqueado (G236R/L328R) o de versiones de IgG1 WT de anticuerpo anti-FITC, y 2 µg/mL de anticuerpo anti-[µ].

25 Figura 51. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b(SN8)-G236R/L328R, anti-CD86 marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o versiones con FcγR bloqueado (G236R/L328R) de anticuerpo anti-FITC.

Figura 52. Ensayo de luminiscencia dependiente de ATP que mide la proliferación de células B en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD79b(SN8)-G236R/L328R, anti-HLA-DR marcado con FITC, y concentraciones variables de variante de FcγRIIb mejorada (S267E/L328F) o versiones con FcγR bloqueado (G236R/L328R) de anticuerpo anti-FITC.

30 Figura 53. Resumen de resultados del escrutinio de antígeno diana en función de la capacidad de los antígenos para modular la activación de células B cuando se co-dirigen con un unión de alta afinidad de FcγRIIb. Los resultados son del ensayo de viabilidad de células B de luminiscencia dependiente de ATP o del ensayo de movilización de calcio usando versiones variantes de Fc de anticuerpos con especificidad por los antígenos diana indicados (estrategia de variante de Fc) o versiones variantes de Fc del anticuerpo anti-FITC junto con anticuerpos comerciales con especificidad por los antígenos diana indicados (estrategia de Hapteno).

Figura 54. Secuencias de aminoácidos de regiones variables, regiones constantes de cadena pesada y anticuerpos de longitud completa.

### Descripción detallada

La invención queda definida por las reivindicaciones anexas.

40 La respuesta inmune humoral (p.ej., el resultado de diversas respuestas de células B) puede iniciarse cuando las células B son activadas por un antígeno y posteriormente diferenciadas en células de plasma. La unión de receptores de célula B ligados a membrana (BCR) sobre las células B a un antígeno activa una cascada de señalización intracelular, que incluye la movilización de calcio, lo cual conduce a la proliferación y diferenciación de células. El co-enfrentamiento de BCR cognado con el receptor de Fc inhibitor (FcγRIIb) inhibe las señales de activación de células B a través de un lazo de retroalimentación negativa.

45 La importancia de FcγRIIb en la regulación negativa de respuestas de célula B ha sido demostrada usando ratones deficientes en FcγRIIb, que no pueden regular las respuestas humorales (Wernersson, S. et al., 1999, J. Immunol. 163, 618-622), están sensibilizados frente a artritis inducida por colágeno (Yuasa, T. et al., 1999, J. Exp. Med. 189, 187-194), y desarrollan enfermedades tipo lupus (Fukuyama, H. et al., J.V., 2005, Nat. Immunol. 6, 99-106; McGaha, T.L. et al., 2005, Science 307, 590-593) y el síndrome de Goodpasture (Nakamura, A. et al., 2000, J. Exp. Med. 191, 899-906). La desregulación de FcγRIIb también se ha asociado a enfermedad autoinmune en humanos. Por ejemplo, los polimorfismos en el dominio de promotor (Blank, M.C. et al., 2005, Hum. Genet. 117, 220-227; Olfieriev, M. et al., 2007, J. Biol. Chem. 282, 1738-1746) y de transmembrana (Chen, J.Y. et al., 2006, Arthritis Rheum. 54, 3908-3917; Floto, R. A. et al., Nat. Med. 11, 1056-1058; Li, X. et al., 2003, Arthritis Rheum. 48, 3242-3252) de FcγRIIb se han relacionado con un aumento de la prevalencia de lupus eritematoso sistémico (SLE). Los pacientes

de SLE también muestran una expresión superficial de FcγRIIb reducida sobre células B (Mackay, M. et al., 2006, J. Exp. Med. 203, 2157-2164; Su, K. et al., 2007, J. Immunol. 178, 3272-3280) y, en consecuencia, exhiben una señalización de calcio desregulada (Mackay, M. et al., 2006, J. Exp. Med. 203, 2157-2164). El papel fundamental de FcγRIIb en la regulación de las células B, soportado por modelos de ratón y por la evidencia clínica, lo convierten en una diana terapéutica atractiva para controlar trastornos autoinmunes e inflamatorios (Pritchard, N.R. y Smith, K.G., 2003, Immunology 108, 263-273; Ravetch, J.V. & Lanier, L.L., 2000, Science 290, 84-89; Stefanescu, R.N. et al., 2004, J. Clin. Immunol. 24, 315-326).

En la presente memoria se describen anticuerpos que imitan los efectos inhibidores del co-enfrentamiento de BCR cognado con FcγRIIb en células B. Por ejemplo, en la presente memoria se describen anticuerpos anti-CD19 variantes diseñados de tal modo que el dominio Fc se une a FcγRIIb con una afinidad hasta 430 veces superior. En comparación con la IgG1 nativa, las variantes de unión mejorada de FcγRIIb (MbE) inhiben fuertemente la movilización de calcio inducida por BCR y la viabilidad en células B humanas primarias. Los efectos inhibidores implicados en la fosforilación de inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene SH2 (SHIP), que se sabe que está implicada en la retroalimentación negativa de la activación de células B inducida por FcγRIIb. El co-enfrentamiento de BCR y FcγRIIb por parte de variantes MbE también solventa los efectos anti-apoptóticos de la activación de BCR. El uso de único anticuerpo para suprimir las funciones de las células B mediante el co-enfrentamiento de BCR cognado y FcγRIIb puede representar una nueva estrategia en el tratamiento de enfermedades mediadas por células B. Los ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por células B incluyen malignidades hematológicas, autoinmunidad, respuestas alérgicas, etc.

En la presente memoria se describen varias definiciones. Dichas definiciones pretenden abarcar los equivalentes gramaticales.

Con “ADCC” o “citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la reacción mediada por célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo ligado sobre una célula diana y a continuación producen la lisis de la célula diana.

Con “ADCP” o fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la reacción mediada por célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo ligado sobre una célula diana y a continuación producen la fagocitosis de la célula diana.

Con “anticuerpo” en la presente memoria se pretende indicar una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por todos los genes de inmunoglobulina reconocidos o por una parte de los mismos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en humanos, incluyen kappa (K), lambda ([Lambda]) y las localizaciones genéticas de cadena pesada, que juntos comprenden la miríada de genes de región variable, los genes de región constante mu ([upsilon]) delta ([delta]), gamma (γ), sigma ([sigma]), y alfa ([alfa]) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. En la presente memoria se pretende que anticuerpo incluya anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo, y puede referirse a un anticuerpo natural procedente de cualquier organismo, un anticuerpo diseñado, o un anticuerpo generado recombinantemente para fines experimentales, terapéuticos o de otro tipo.

Con “aminoácido” e “identidad de aminoácido” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquiera de sus análogos no naturales que puedan estar presentes en una posición específica definida.

Con “célula CD32b<+>” o “célula FcγRIIb<sup>+</sup>” tal como se usa en la presente memoria pretende indicar cualquier célula o tipo de célula que expresa CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b<sup>+</sup> incluyen, aunque sin limitación, células B, células de plasma, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos.

Con “CDC” o “citotoxicidad dependiente de complemento” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar la reacción en la que uno o más componentes de proteína complemento reconocen el anticuerpo ligado sobre una célula diana y a continuación producen la lisis de la célula diana.

Con “región constante” de un anticuerpo tal como se define en la presente memoria se pretende indicar la región del anticuerpo que está codificada por uno de los genes de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada. Por “cadena ligera constante” o “región constante de cadena ligera” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la región de un anticuerpo codificado por las cadenas ligeras kappa (CK) o lambda (C[lambda]). La cadena ligera constante típicamente comprende un único dominio, y tal como se define en la presente memoria se refiere a las posiciones 108-214 de CK o C[lambda], en donde la numeración es según el índice EU. Por “cadena pesada constante” o “región constante de cadena pesada” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la región de un anticuerpo codificada por los genes mu, delta, gamma, alfa o épsilon para definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA o IgE, respectivamente. Para los anticuerpos de IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, tal como se define en la presente memoria, se refiere al extremo N del dominio CH1 al extremo C del dominio CH3, comprendiendo de esta manera las posiciones 118-447, en donde la numeración es según el índice EU.

Con “función efectora” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un evento bioquímico que es resultado de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC y ADCP, y funciones efectoras mediadas por complemento tales como CDC. Adicionalmente, las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por Fc[κappa]RMB, tal como funciones inhibitoras (p.ej., de regulación a la baja, reductoras, inhibitoras, etc., respuestas de célula B, p.ej., una respuesta inmune humoral).

Con “célula efectora” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores de Fc y/o de complemento, y que media en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, aunque sin limitación, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T γ[delta], y pueden proceder de cualquier organismo, incluyendo, aunque sin limitación, humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Con “Fab” o “región Fab” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH 1, VH y CL. Fab se puede referir a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o de un fragmento de anticuerpo.

Con “Fc” o “región Fc”, tal como se usan en la presente memoria, se pretende indicar el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. De esta manera, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y a los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y al extremo N-terminal de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cγ2 y Cγ3 (Cγ2 y Cγ3) y la bisagra entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). Aunque las fronteras de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente comprendiendo los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, tal como se describe a continuación.

Con “polipéptido de Fc” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido que comprende la totalidad o una parte de la una región de Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fcs aislados y fragmentos de Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser polipéptidos de Fc.

Con “fusión de Fc” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una proteína en la que uno o más polipéptidos están ligados operativamente a Fc. Fusión de Fc en la presente memoria pretende ser sinónimo de términos tales como “inmuno adhesina”, “fusión de Ig”, “quimera de Ig” y “globulina receptora” (algunas veces con guiones) tal como se usan en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195- 200). Una fusión de Fc combina la región de Fc de una inmunoglobulina con una pareja de fusión, que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de una fusión de Fc, es decir, la pareja de fusión, es mediar en la unión a diana, y por tanto es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo. Virtualmente se puede ligar cualquier proteína o molécula pequeña a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteína pueden incluir, aunque sin limitación, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, p.ej., un receptor extracelular que esté implicado en la enfermedad.

Con “receptor de Fc gamma” o “FcγR” tal como se usa en al presente memoria se pretende indicar cualquier miembro de la familia de proteínas que se une a la región de Fc del anticuerpo IgG y que es codificado sustancialmente por los genes FcγR. En humanos, esta familia incluye, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb- NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65), así como cualesquier isoformas o alotipos de FcγRs o FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, incluyen, aunque sin limitación, humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγRs de ratón incluyen, aunque sin limitación, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualesquier isoformas o alotipos de FcγRs de ratón no descubiertos.

Con “ligando de Fc” o “receptor de Fc” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar una molécula, p.ej., un polipéptido, procedente de cualquier organismo que se une a la región de Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen, aunque sin limitación, FcγRs, FcγRs, FcγRs, FcRn, C1 q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de estafilococo, proteína G de estreptococo, y FcγR vírico. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos de receptor de Fc (FcRH), que son una familiar de receptores de Fc que son homólogos a los FcγRs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

- 5 Con “anticuerpo de longitud completa” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, que incluyen humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero que consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada para con una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera con dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada con dominios de inmunoglobulina VH, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3. En algunos mamíferos, por ejemplo camellos y llamas, los anticuerpos de IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada con un dominio variable unidos a la región de Fc.
- 10 Con “inmunoglobulina” en la presente memoria se pretende indicar una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos (que incluyen anticuerpos bi-específicos) y fusiones de Fc. Las inmunoglobulinas pueden presentar una serie de formas estructurales, que incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, y dominios individuales de inmunoglobulina.
- 15 Con “dominio de inmunoglobulina (Ig)” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta, según lo puede determinar un especialista en la técnica de estructuras proteínicas. Los dominios de Ig típicamente tienen una topología de plegamiento [beta]-sándwich característica. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo de IgG de anticuerpos son VH C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, VL y CL.
- 20 Con “IgG” o “inmunoglobulina IgG” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están codificados sustancialmente por un gen reconocido de inmunoglobulina gamma. En humanos, esta clase comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Con “isotipo” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de inmunoglobulina humana son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE.
- 25 Con “modificación” en la presente memoria se pretende indicar una alteración de las propiedades físicas, químicas o de secuencia de una proteína, polipéptido, anticuerpo o inmunoglobulina. Las modificaciones descritas en la presente memoria incluyen modificaciones de aminoácido y modificaciones de glicofomas.
- 30 Con “modificación de aminoácidos” en la presente memoria se pretende indicar una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. Con “sustitución de aminoácidos” o “sustitución” en la presente memoria se pretende indicar el reemplazamiento de un aminoácido de una posición concreta en la secuencia de un polipéptido original por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S267E se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de cadena pesada constante, en el que la serina de la posición 267 es reemplazada por ácido glutámico. Con “inserción de aminoácido” o “inserción” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la adición de un aminoácido en una posición particular de una secuencia de polipéptido original. Con “eliminación de aminoácido” o “eliminación” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar la eliminación de un aminoácido en una posición particular de una secuencia de polipéptido original.
- 35 Con “modificación de glicofoma” o “glicofoma modificada” o “glicofoma diseñada” tal como se usan en la presente invención se pretende indicar una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una proteína original. La glicofoma modificada típicamente se refiere al diferente carbohidrato u oligosacárido; por ejemplo, de esta manera una variante de Fc puede comprender una glicofoma modificada. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la variante de Fc que comprende el diferente carbohidrato u oligosacárido.
- 40 Con “polipéptido original”, “proteína original”, “inmunoglobulina original”, “polipéptido precursor”, “proteína precursora” o “inmunoglobulina precursora” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido, proteína o inmunoglobulina no modificados que es modificado posteriormente para generar una variante, p.ej., cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que sirva como plantilla y/o base para al menos una modificación de aminoácidos descrita en la presente memoria. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural, o una versión variante o diseñada de un polipéptido natural. El polipéptido original puede referirse al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido original, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, con “polipéptido de Fc original” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido de Fc que es modificado para generar un polipéptido de Fc variante, y con “anticuerpo original” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un anticuerpo que es modificado para generar un anticuerpo variante (p.ej., un anticuerpo original puede incluir, aunque sin limitación, una proteína que comprende la región constante de una Ig natural).
- 45 Con “posición” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones se pueden numerar secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo el índice EU como en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición del anticuerpo IgG1 humano.
- 50
- 55

Con “polipéptido” o “proteína” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

5 Con “residuo” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una posición en una proteína y está asociada a la identidad de aminoácido. Por ejemplo, Asparagina 297 (también referida como Asn297, también referida como N297) es un residuo del anticuerpo IgG1 humano.

Con “antígeno diana” tal como se usa en la presente invención se pretende indicar la molécula que está ligada a la región variable de un anticuerpo dado, o la pareja de fusión de una fusión de Fc. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. Un anticuerpo o fusión de Fc se dice que son “específicos” para un antígeno diana dado en base a la afinidad que presentan por el antígeno diana.

10 Con “célula diana” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una célula que expresa un antígeno diana.

15 Con “región variable” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes VK, V[lambda], y/o VH que constituyen las localizaciones genéticas de inmunoglobulina kappa, lambda y de cadena pesada, respectivamente.

20 Con “polipéptido variante”, “variante de polipéptido” o “variante” tal como se usan en la presente memoria pretende indicar una secuencia de polipéptido que difiere de la secuencia de un polipéptido original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural o “wild-type” (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido WT. El polipéptido variante puede referirse al propio polipéptido, a una composición que comprende el polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes descritos en la presente memoria (p.ej., inmunoglobulinas variantes) pueden presentar al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido original, p.ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácido, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácido, etc., con respecto al original. La secuencia de polipéptido variante en la presente memoria puede poseer al menos un 80% de homología con respecto a una secuencia de polipéptido original, p.ej., una homología de al menos aproximadamente un 90%, un 95%, etc. Por consiguiente, con “variante de Fc” o “Fc variante” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. Una variante de Fc puede abarcar solo una región de Fc, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, una fusión de Fc, un Fc aislado, un fragmento de Fc, u otro polipéptido que está codificado sustancialmente por Fc. Variante de Fc puede referirse al propio polipéptido de Fc, a composiciones que comprenden el polipéptido variante de Fc, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Con “variante de polipéptido de Fc” o “polipéptido de Fc variante” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido de Fc que difiere de un polipéptido de Fc original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. Con “variante de proteína” o “proteína variante” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una proteína que difiere de una proteína original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. Con “variante de anticuerpo” o “anticuerpo variante” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un anticuerpo que difiere de un anticuerpo original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. Con “variante de IgG” o “IgG variante” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un anticuerpo que difiere de una IgG original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. Con “variante de inmunoglobulina” o “inmunoglobulina variante” tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina original en virtud a al menos una modificación de aminoácido.

45 Con “wild-type” o “WT” en la presente memoria se pretende indicar una secuencia de aminoácido o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo las variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc., WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no ha sido modificada intencionadamente.

#### Inmunoglobulinas

Tal y como se describe en la presente memoria, una inmunoglobulina puede ser un anticuerpo, una fusión de Fc, un Fc aislado, un fragmento de Fc o un polipéptido de Fc. En una realización, una inmunoglobulina es un anticuerpo.

50 Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, que incluyen humanos y ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas de polipéptido pesadas y ligeras emparejadas. Las regiones variables de cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos, y son responsables de la unión del antígeno diana. Cada cadena está constituida por hasta cuatro dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales, y por tanto el término genérico inmunoglobulina se usa para dichas proteínas.

55 Las unidades estructurales de anticuerpo tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, presentando cada para una cadena “ligera” (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (que tiene

típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA1 e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, que incluyen, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases, que incluyen, aunque sin limitación, IgM1 e IgM2. La IgA presenta varias subclases, que incluyen, aunque sin limitación, IgA1 e IgA2. Por tanto, "isotipo" tal como se usa en la presente memoria pretende indicar cualquiera de las clases y subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

Cada una de las cadenas ligeras y pesadas está constituida por dos regiones distintas, referidas como regiones variables y constantes. La cadena pesada de IgG está compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al extremo C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, que se refieren al dominio variable de cadena pesada, al dominio constante de cadena pesada 1, al dominio constante de cadena pesada 2, y al dominio constante de cadena pesada 3, respectivamente (también referidos como VH-Cy1-Cy2-Cy3, que se refieren al dominio variable de cadena pesada, al dominio constante gamma 1, al dominio constante gamma 2, y al dominio constante gamma 3, respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al extremo C en el orden VL-CL, que se refieren al dominio variable de cadena ligera y al dominio constante de cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencia, y son responsables de la unión de una serie de proteínas naturales para provocar eventos bioquímicos importantes. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias más sutiles en la región variable.

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión de antígeno de la molécula, y determina de esta manera la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se denomina así porque es la más distinta en secuencia de los otros anticuerpos de la misma clase. La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principales del reconocimiento de antígeno. En la región variable, se reúnen tres lazos para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los lazos es referido como región determinante de complementariedad (denominadas a partir de este momento "CDR"), en la que la variación de la secuencia de aminoácidos es más significativa. Existen 6 CDRs en total, tres en cada cadena, pesada y ligera, designados VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3. La región variable fuera de las CDRs se denomina región estructural (FR). Aunque no tan diversas como las CDRs, existe variabilidad de secuencia en la región FR entre diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de anticuerpos proporciona una estructura estable (la región FR) sobre la cual el sistema inmune puede explorar una diversidad sustancial de unión a antígeno (las CDRs) para obtener especificidad para un amplio abanico de antígenos. Se dispone de una serie de estructuras de alta resolución para una variedad de fragmentos de región variable procedentes de diferentes organismos, algunos ligados y algunos formando complejo con antígeno. Las características de secuencia y estructurales de las regiones variables de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Morea et al., 1997, *Biophys Chem* 68: 9-16; Morea et al., 2000, *Methods* 20: 267-279, y las características conservadas de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Maynard et al., 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-376.

La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Con "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente memoria se pretende indicar una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en las realizaciones descritas en la presente memoria son los dominios de cadena pesada, que incluyen los dominios pesados constantes (CH) y la región de bisagra. En el contexto de los anticuerpos de IgG, los isotipos de IgG tienen tres regiones CH cada uno. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son como se indica a continuación: "CH 1" se refiere a las posiciones 118-220 según el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 según el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice EU como en Kabat.

Otra región importante de la cadena pesada es la región de bisagra. Con "bisagra" o "región de bisagra" o "región de bisagra de anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en la presente memoria se pretende indicar el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG acaba en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición de residuo EU 237. Por tanto, para IgG la bisagra de anticuerpo se define en la presente memoria para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región de Fc, se incluye la bisagra inferior, refiriéndose de forma general "bisagra inferior" a las posiciones 226 o 230 a 236.

De interés en las realizaciones descritas en la presente memoria son las regiones de Fc. Con "Fc" o "región de Fc", tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el dominio de inmunoglobulina de la primera región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por tanto, Fc se refiere a al menos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal a dichos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la región de bisagra inferior entre Cgamma1 (Cy1) y

Cgamma2 (Cγ2). Aunque las fronteras de la región de Fc pueden variar, la región de Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define incluyendo los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, tal como se describe más adelante. Con "polipéptido de Fc" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un polipéptido que comprende la totalidad o parte de una región de Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fcs aislados y fragmentos de Fc.

La región de Fc de un anticuerpo interacciona con una serie de receptores y ligandos de Fc, confiriendo un conjunto de importantes capacidades funcionales denominadas funciones efectoras. Para la región de Fc de IgG, Fc comprende los dominios de Ig Cγ2 y Cγ3 y la bisagra N-terminal que conduce a Cγ2. Una familia importante de receptores de Fc para la clase IgG son los receptores gamma de Fc (FcγRs). Estos receptores median en la comunicación entre anticuerpos y el brazo celular del sistema inmune (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). En humanos esta familia de proteínas incluye FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). Estos receptores típicamente tienen un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región que se extiende a la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar en algún evento de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans<1>, células asesinas naturales (NK), y células T γγ. La formación del complejo Fc/FcγR recluta estas células efectoras a los sitios de antígeno unido, dando como resultado típicamente eventos de señalización dentro de las células, y posteriores respuestas inmunes importantes tales como la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad para mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial mediante el cual los anticuerpos destruyen células diana. La reacción mediada por célula en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo ligado sobre una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana, se denomina citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). La reacción mediada por célula en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen anticuerpo ligado sobre una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana, se denomina fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los FcγRs, típicamente dando lugar a uniones sustancialmente mejores la IgG1 y la IgG3 a los receptores que la IgG2 y la IgG4 (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Los FcγRs se unen a la región de Fc de la IgG con diferentes afinidades. Los dominios extracelulares de FcγRIIIa y FcγRIIIb son idénticos en un 96%, sin embargo FcγRIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que FcγRI, FcγRIIa/c y FcγRIIIa son reguladores positivos de la activación inmune activada por complejo, que se caracterizan por presentar un dominio intracelular que tiene una estructura de activación basada en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), FcγRIIb tiene una estructura de inhibición basada en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) y por tanto es inhibidor. De esta manera los primeros son conocidos receptores de inhibición, mientras que FcγRIIb es conocido como receptor de activación. A pesar de estas diferencias en afinidades y actividades, todos los FcγRs se unen a la misma región de Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cγ2 y en la bisagra precedente. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann et al., 2001, *J Mol Biol* 309: 737-749), y se han resuelto varias estructuras de la Fc humana ligada al dominio extracelular del FcγRIIIb humano (código de acceso pdb 1 E4K) (Sondermann et al., 2000, *Nature* 406: 267-273) (códigos de acceso pdb 1 MS y 1 MX) (Radaev et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477).

Un sitio solapante pero separado en la Fc sirve como interfaz para la proteína de complemento C1q. De la misma manera que la unión Fc/FcγR media en la ADCC, la unión Fc/C1q media en la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cγ2 y Cγ3 media en la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión al cual recicla anticuerpos endocitados procedentes del fondo endosomático de la corriente sanguínea (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766). Este proceso, acoplado a la preclusión de la filtración renal debida al tamaño grande de la molécula de longitud completa, da como resultado vidas medias en suero de anticuerpo favorables que oscilan entre una y tres semanas. La unión de Fc a FcRn también desempeña un papel fundamental en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión para FcRn sobre Fc también es el sitio al cual se unen las proteínas bacterianas A y G. La unión estrecha por parte de estas proteínas es explotada típicamente como medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G durante la purificación de proteínas. La fidelidad de estas regiones, las regiones de unión de complemento y FcRn/proteína A son importantes tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos como para su desarrollo.

Una característica fundamental de la región de Fc es la glicosilación N-ligada conservada que se produce en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como es definido a veces, desempeña un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las principales razones de que los anticuerpos deban ser producidos usando sistemas de expresión de mamífero. La unión eficiente de Fc a FcγR y a C1q requiere esta modificación, y las alteraciones en la

composición del carbohidrato N297 o su eliminación afectan a la unión de estas proteínas (Umana et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Mimura et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 45539-45547.; Radaev et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483; Shields et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Simmons et al., 2002, *J Immunol Methods* 263: 133-147).

5 Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en la presente memoria también pueden ser una proteína de tipo anticuerpo referida como fusión de Fc (Chamow et al., 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). "Fusión de Fc" en la presente memoria pretende ser sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig" y "globulina receptora" (algunas veces con guiones) tal como se usan en la técnica previa (Chamow et al., 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). Una fusión de Fc es una proteína en la que uno o más polipéptidos, referidos en la presente memoria como "pareja de fusión", están ligados operativamente a Fc. Una fusión de Fc combina la región de Fc de un anticuerpo, y por tanto sus funciones efectoras y farmacocinética favorables, con la región de unión a diana de un receptor, ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. El papel de ésta última es mediar en el reconocimiento de la diana, y por tanto es funcionalmente análoga a la región variable de anticuerpo. Debido al solapamiento estructural y funcional de las fusiones de Fc con anticuerpos, la discusión sobre anticuerpos en la presente descripción se extiende también a las fusiones de Fc.

Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña se pueden ligar a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteína pueden incluir, aunque sin limitación, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente que dirija la fusión de Fc a un antígeno diana. Dicho antígeno diana puede ser cualquier molécula, p.ej., un receptor extracelular, que esté implicado en la enfermedad. Las fusiones de Fc de las realizaciones descritas en la presente memoria pueden dirigirse virtualmente a antígenos que sean expresados en células CD32b<sup>+</sup>.

Las parejas de fusión pueden ligarse a cualquier región de una región de Fc, incluyendo en el extremo N o C, o en algún residuo entre los extremos. En una realización, una pareja de fusión es ligada en el extremo N o C de la región de Fc. Se puede usar una variedad de ligandos en algunas realizaciones descritas en la presente memoria para unir covalentemente regiones de Fc a una pareja de fusión. Con "ligando", "secuencia de ligando", "espaciador", "secuencia de enlace" o equivalentes gramaticales de los mismos, en la presente memoria se pretende indicar una molécula o grupo de moléculas (tal como un monómero o un polímero) que conecta dos moléculas y que a menudo sirve para ubicar las dos moléculas en una configuración. Los ligandos son conocidos en la técnica; por ejemplo, los bien conocidos ligandos homo- o hetero-bifuncionales (véase el catálogo 1994 Pierce Chemical Company, sección técnica sobre ligandos cruzados, páginas 155-200). Se puede usar una serie de estrategias para unir covalentemente moléculas. Éstas incluyen, aunque sin limitación, enlaces de polipéptido entre los extremos N y C de proteínas o dominios de proteínas, unión vía enlaces de disulfuro, y unión vía reactivos reticulantes químicos. En un aspecto de esta realización, el ligando es un enlace de péptido, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido ligando puede incluir de forma predominante los siguientes residuos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido ligando debería tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de un modo tal que asuman la conformación correcta una respecto a la otra, de tal modo que mantengan su actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este fin incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácido. En una realización, el ligando tiene una longitud de entre 1 y 30 aminoácidos. En una realización, se pueden usar ligandos con una longitud de 1 a 20 aminoácidos.

Los ligandos útiles incluyen polímeros glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEQ ID NO: 1), (GGGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEQ ID NO: 2), y (GGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEQ ID NO: 3), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina, y otros ligandos flexibles, como podrán apreciar los especialistas en la técnica. Alternativamente, se pueden usar como ligandos una variedad de polímeros no proteínicos, que incluyen, aunque sin limitación, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, poli-oxialquilenos, o copolímeros de polietileno glicol y polipropileno glicol, es decir, se pueden usar para unir regiones de Fc a una pareja de fusión.

También se contemplan como parejas de fusión los polipéptidos de Fc. De esta manera, una inmunoglobulina tal como se describe en la presente memoria puede ser un polipéptido de Fc multimérico, que comprende dos o más regiones de Fc. La ventaja de dicha molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para receptores de Fc con una única molécula de proteína. En una realización, las regiones de Fc se pueden ligar usando una estrategia de ingeniería química. Por ejemplo, se pueden ligar Fab's y Fc's mediante enlaces de tioéter que se origina en residuos de cisteína de las bisagras, generando moléculas tales como FabFc2. Las regiones de Fc se pueden ligar usando ingeniería de disulfuro y/o reticulante químico. En una realización, las regiones de Fc se pueden ligar genéticamente. En una realización, las regiones de Fc en una inmunoglobulina se unen genéticamente a regiones de Fc ligadas en tándem tal como se describe en el documento USSN 11/022.289, presentado el 21-12-2004, titulado "Fc polypeptides with novel Fc ligand binding sites". Los polipéptidos de Fc ligados en tándem pueden comprender dos o más regiones de Fc, p.ej., de una a tres regiones de Fc, dos regiones de Fc. Puede ser ventajoso explorar una serie de construcciones de ingeniería a fin de obtener regiones de Fc ligadas en homo- o hetero-tándem con las propiedades estructurales y funcionales más favorables. Las regiones de Fc ligadas en tándem pueden ser regiones de Fc ligadas en homo-tándem, es decir una región de Fc de un isótopo está fusionada genéticamente con otra

región de Fc del mismo isotipo. Se anticipa que debido a que hay múltiples sitios de unión de Fc $\gamma$ R, C1q y/o FcRn en los polipéptidos de Fc ligados en tándem, las funciones efectoras y/o la farmacocinética se pueden ver potenciadas. En una realización alternativa, las regiones de Fc de diferentes isotipos pueden ligarse en tándem, referidas como regiones de Fc ligadas en hetero-tándem. Por ejemplo, puesto que la capacidad de dirigirse a receptores Fc $\gamma$ R y Fc[ $\sigma$ ]RI, una inmunoglobulina que se une tanto a Fc $\gamma$ Rs como a Fc[ $\sigma$ ]RI puede proporcionar una mejora clínica significativa.

Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en la presente memoria pueden estar codificadas sustancialmente por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. En determinadas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria encuentran uso en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a la clase IgG de anticuerpos, que incluyen IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La Figura 1 proporciona un alineamiento de dichas secuencias de IgG humana. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria encuentran uso en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG o IgM. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden comprender más de una cadena de proteína, p.ej., puede haber un anticuerpo o una fusión de Fc que sea un monómero o un oligómero, incluyendo un homo- o hetero-oligómero.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden estar codificadas sustancialmente por genes procedentes de cualquier organismo, p.ej., mamíferos (que incluyen, aunque sin limitación, humanos, roedores (que incluyen, aunque sin limitación, ratones y ratas), lagomorfos (que incluyen, aunque sin limitación, conejos y liebres), camélidos (que incluyen, aunque sin limitación, camellos, llamas y dromedarios), y primates no humanos, que incluyen, aunque sin limitación, prosimios, platirinos (monos del Nuevo Mundo), cercopitécidos (monos del Viejo Mundo) y hominoideos que incluyen los gibones y simios menores y grandes simios. En una realización determinada, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden ser sustancialmente humanas.

Como es bien conocido en la técnica, existen polimorfismos de inmunoglobulina en la población humana. El polimorfismo Gm está determinado por los genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que presentan alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos denominados alotipos G1m, G2m y G3m para marcadores de las moléculas de IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se han descubierto alotipos de Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores se pueden clasificar en "alotipos" e "isoalotipos". Éstos se distinguen en diferentes bases serológicas dependientes de las fuertes homologías de secuencia entre los isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicos especificados por formas alélicas de los genes de Ig. Los alotipos representan ligeras diferencias en las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras de los diferentes individuos. Incluso una única diferencia de aminoácido puede dar lugar a un determinante alotípico, aunque en muchos casos existen varias sustituciones de aminoácidos que se han producido. Los alotipos son diferencias de secuencia entre alelos de una subclase, mediante las cuales los antisueros reconocen solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que es compartido con una región homóloga no polimórfica de uno o más isotipos diferentes, y debido a esto los antisueros reaccionarán con los alotipos relevantes y los isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem Immunol. 65: 88-110; Gorman y Clark, 1990, Semin Immunol 2(6): 457-66).

Las formas alélicas de las inmunoglobulinas humanas han sido bien caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357- 362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Adicionalmente, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54: 1-9). En la actualidad, se conocen 18 alotipos de Gm: G1 m (1 , 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11 , 13, 14, 15, 16, 21 , 24, 26, 27, 28) o G3m (b1 , c3, b5, b[theta], b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pág. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se heredan en combinaciones fijas se denominan haplotipos Gm. La Figura 2 muestra haplotipos comunes de la cadena gamma de la IgG1 humana (Figura 2A) y de la IgG2 humana (Figura 2A), mostrando las posiciones y las sustituciones de aminoácidos relevantes. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden estar codificadas sustancialmente por cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden componer un polipéptido de Fc, que incluye, aunque sin limitación, anticuerpos, Fcs aislados, fragmentos de Fc y fusiones de Fc. En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria es un anticuerpo de longitud completa, que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. Para el isotipo de IgG, el anticuerpo de longitud completa es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, presentando cada una para una cadena ligera y una pesada, cada cadena ligera comprendiendo dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprendiendo dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3. En otra realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria son regiones de Fc aisladas o fragmentos de Fc.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden ser una variedad de estructuras, que incluyen, aunque sin limitación, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos bi-específicos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces referidos en la presente memoria como "miméticos de anticuerpo"),

anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpo (algunas veces referidos como “conjugados de anticuerpo”), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

5 En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, aunque sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que  
 10 consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb, que consiste en una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados, (vii) moléculas Fv de cadena individual (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos a través de un ligando peptídico que permite a los  
 15 dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) dímeros Fv de cadena sencilla bi-específicos, y (ix) “diacuerpos” o “triacuerpos”, fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos mediante fusión génica. Los fragmentos de anticuerpo pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la  
 20 incorporación de puentes de disulfuro que unan los dominios VH y VL. Los ejemplos de formatos de anticuerpo y arquitecturas se describen en Holliger y Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6: 343-357, y las referencias ahí citadas.

25 En una realización, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo multi-específico, un de forma notable un anticuerpo bi-específico, a veces referido como “diacuerpo”. Éstos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden fabricarse en una variedad de formas conocidas en la técnica, p.ej., se pueden preparar químicamente o a partir de hibridomas híbridos. En una realización, el anticuerpo  
 30 es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio de CH3. En algunos casos, el scFv puede estar unido a la región de Fc, y puede incluir parte o toda la región de bisagra. Para una descripción de anticuerpos multi-específicos véase Holliger & Hudson, 2006, Nature  
 35 Biotechnology 23(9): 1126-1136 y las referencias ahí citadas.

Anticuerpos no humanos, quiméricos, humanizados y completamente humanos

40 La región variable de un anticuerpo, como es sabido en la técnica, puede comprender secuencias procedentes de una variedad de especies. En algunas realizaciones, la región variable del anticuerpo puede proceder de una fuente no humana, que incluye, aunque sin limitación, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas y monos. En algunas realizaciones, los componentes estructurales pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En  
 45 general, tanto “anticuerpos quiméricos” como “anticuerpos humanizados” se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, “anticuerpos quiméricos” tradicionalmente comprende región(es) variable(s) de un ratón u otra especie no humana y región(es) constante(s) de un humano.

50 “Anticuerpos humanizados” generalmente se refiere a anticuerpos no humanos a los que se han cambiado regiones estructurales de dominio variable con secuencias presentes en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDRs, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDRs. Las CDRs, algunas de las cuales o todas  
 55 están codificadas por ácidos nucleicos que proceden de un organismo no humano, son ancladas en la estructura de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad viene determinada por las CDRs injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, p.ej., en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536.

60 A menudo se requiere la “retromutación” de residuos estructurales de aceptor seleccionados a los correspondientes residuos donantes para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (Patente de EE.UU. n° 5.693.762). El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por tanto típicamente comprenderá una región de Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden ser generados usando ratones con un sistema inmune modificado genéticamente. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654. En la técnica se conocen bien una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y las referencias ahí citadas). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpo no humano pueden incluir métodos re-superficialización, tal como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973. En una realización, el anticuerpo original ha sido madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Se pueden emplear métodos basados en estructura para la humanización y la maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 11/004.590. Los métodos basados en selección se pueden emplear para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpo, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de tan solo partes de las CDRs, que incluyen, aunque sin limitación, métodos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 09/810.502; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084. Los métodos basados en estructura se pueden emplear para humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. con n° de serie 10/153.159 y en solicitudes relacionadas. En determinadas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce usando un método descrito

en la Solicitud de Patente de EE.UU. con nº de serie 11/004.590, titulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", presentada el 3 de diciembre de 2004.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano con al menos una modificación como se describe en la presente memoria. "Anticuerpo complementa humano" o "anticuerpo humano completo" se refieren a un anticuerpo humano que tiene la secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano con las modificaciones descritas en la presente memoria. Los anticuerpos completamente humanos se pueden obtener, por ejemplo, usando ratones transgénicos (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8: 455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos combinadas con métodos de selección (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9: 102-108).

#### Antígenos diana

La inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se pueden dirigir contra virtualmente cualquier antígeno, incluyendo, aunque sin limitación, proteínas, subunidades, dominios, estructuras y/o epítomos que pertenezcan a la siguiente lista de dianas: 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1 a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, A1 Adenosina Receptor, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1- antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPARTICO, factor natriurético atrial, av/b3 integrina, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocito B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP- 2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 VgM, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP- 2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor de complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, cAMP, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a carcinoma, catepsina A, catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina XIZIP, CBL, CCI, CCK2, CCL1 CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11C, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de Clostridium botulinum, toxina de Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor acelerador de decaimiento, factor, des(1- 3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, Enkefalinasa, eNOS, Eot, eotaxini, EpCAM, Efrina B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor Ma, Factor VII, Factor VIIIc, Factor IX, proteína de activación de fibroblasto (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF- 19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimulante de folículo, fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP- 13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFRalfa3, GITR, Glucagon, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de hormona de crecimiento, Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de envoltura HCMV gB, HCMV) glicoproteína de envoltura gH, HCMV UL, factor de crecimiento hemopoyético, (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína gB de virus de herpes simple (HSV), glicoproteína gD de HSV, HGFA, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HIV gp120, HIV IMB gp 120 V3 loop, HLA, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD317 / HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardíaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg1 Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión de IGF, IGF-1 R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1 R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF- gamma, Inhibina, iNOS, cadena A de insulina, cadena B de insulina, factor de crecimiento de tipo insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa[delta] (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa[delta], integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, 1-TAC, JE, Caliceína 2, Caliceína 5, Caliceína 6, Caliceína 11, Caliceína 12, Caliceína 14, Caliceína 15, Caliceína L1, Caliceína L2, Caliceína L3, Caliceína L4, KC, KDR, factor de crecimiento de queratocito (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1 latente, TGF-1 bp1 latente, LBP, LDGF1 LECT2, Lefty, antígeno de Lewis-Y, antígeno relacionado con Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, tensioactivo de pulmón, hormona luteinizante, receptor beta de linfotóxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC1 MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-1 1, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-

24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPlF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Mud), MUC18, sustancia inhibidora muelleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Caderina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4, o -6, Neurturina, factor de crecimiento neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, 5 PBSF, PCAD, P-Caderina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentar (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorrelaxina, Proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, Relaxina de cadena A, Relaxina de cadena B, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, factores reumatoides, RLIP76, RP A2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINA, albúmina en suero, sFRP-3, Shh, 10 SIGIRR1 SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína asociada a tumor-72), TARC, TCA-3, receptores de célula T (p.ej., receptor de célula T alfa/beta), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Específico, TGF-beta RI (ALK-5), TGF- beta RII, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de timo, hormona estimulante de tiroides, Tie, TIMP, TIQ, 15 Factor de Tejido, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1 , LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11 B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (REL), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1 B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1 , APT1 , CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 Ligando, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK Ligando ODF, OPG Ligando), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 Ligando, DR3 Ligando), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM Ligando, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR Ligando AITR Ligando, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1 B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 Ligando gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 Ligando CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), 30 TNFSF6 (Fas Ligando Apo-1 Ligando, APT1 Ligando), TNFSF7 (CD27 Ligando CD70), TNFSF8 (CD30 Ligando CD153), TNFSF9 (4-1 BB Ligando CD137 Ligando), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno asociado a tumor CA 125, antígeno asociado a tumor que expresa carbohidrato relacionado con Lewis Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1 , Uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Caderina, VE-caderina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos virales, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR integrina, factor de von Willebrands, WIF-1 , WNT1 , WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento, etc.

En una realización, los antígenos son aquellos que se expresan sobre células CD32b+, p.ej., proteínas de célula B, 40 p.ej., una o más proteínas del complejo de receptor de célula B. Los antígenos diana incluyen, aunque sin limitación, CD19, CD20, CD21 (CR2), CD22, CD23 / Fc[epsilon]RII, Fc[epsilon] RI, (subunidades [alfa], [beta], y gamma), CD24 / BBA-1 / HSA, CD27, CD35 (CR1), CD38, CD40, CD45RA, CD52 / CAMPATH -1 / HE5, CD72, CD79a (Ig[sigma]), CD79b (Ig[beta]), IgM ([mu]), CD80, CD81 , CD86, Leu13, HLA-DR, -DP, -DQ, CD138, CD317 / HM1.24, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD68, CD163, CD172a, CD200R y CD206. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también son específicas para un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: IgM ([mu]), CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD35, CD40, CD45RA, CD72, CD79a, CD79b, 45 CD80, CD81, CD86 y HLA-DR. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también son específicas para un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: IgM ([mu]), CD79a, CD79b, CD19, CD21, CD22, CD72, CD81 y Leu13. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también son específicas para un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: [mu], CD 19, CD79a, Cd79b, CD81 y HLA-DR. En otra realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también son específicas para un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en: CD22, CD40 y CD72.

En otra realización, los antígenos diana pueden incluir aquellos que se unen, o que pueden unirse, a la superficie de 55 las células B. Por ejemplo, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también pueden dirigirse a antígenos autoinmunes (es decir, autoantígenos) o alérgenos. En una realización, los antígenos autoinmunes que pueden ser atacados por las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, ADN de cadena doble, antígenos de plaqueta, antígeno de proteína mielina, antígenos Sm en snRNPs, antígeno de célula de isleta, factor reumatoide, y proteína anticitrulinada, proteínas y péptidos citrulinados tales como CCP-1, CCP-2 (péptidos citrulinados cíclicos), fibrinógeno, fibrina, vimentina, filagrina, péptidos de colágeno I y II, alfa-enolasa, factor de iniciación de la traducción 4G1, factor perinuclear, queratina, Sa (proteína vimentina citoesquelética), componentes de cartílago articular tales como colágeno II, IX y XI, proteínas en suero circulantes tales como RFs (IgG, IgM), fibrinógeno, plasminógeno, ferritina, componentes nucleares tales como RA33/hnRNP A2, Sm, factor de elongación de la traducción eucariótico 1 alfa 1, proteínas de estrés tales como HSP-65, -70, -90, BiP, factores inflamatorios/inmunes tales como B7-H1, IL-1 alfa, e IL-8, enzimas tales como calpastatina, alfa-

5 enolasa, aldolasa-A, dipeptidil peptidasa, osteopontina, glucosa-6-fosfato isomerasa, receptores tales como lipocortina 1, proteínas nucleares neutrófilas tales como lactoferrina y proteína nuclear de 25-35 kD, proteínas granulares tales como proteína de aumento de la permeabilidad bactericida (BPI), elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, proteinasa 3, antígenos de plaqueta, antígeno de proteína mielina, antígeno de célula de isleta, factor reumatoide, histonas, proteínas P ribosómicas, cardioplipina, vimentina, ácidos nucleicos tales como dsADN, ssADN y ARN, partículas ribonucleares y proteínas tales como antígenos Sm (que incluyen, aunque sin limitación, SmD<1> y SmBVB), U1 RNP, A2/B1 hnRNP, Ro (SSA), y antígenos La (SSB).

#### Variantes de Fc y propiedades de unión de receptor de Fc

10 Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden comprender una variante de Fc. Una variante de Fc comprende una o más modificaciones de aminoácido respecto a un polipéptido de Fc original, en donde la(s) modificación(es) de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Una variante de Fc descrita en la presente memoria difiere en la secuencia de aminoácidos de su versión original en virtud a al menos una modificación de aminoácido. De esta manera, las variantes de Fc descritas en la presente memoria tienen al menos una modificación de aminoácido con respecto a la versión original. Alternativamente, las variantes de Fc descritas en la presente memoria pueden presentar más de una modificación de aminoácido con respecto al original, por ejemplo aproximadamente entre una y cincuenta modificaciones de aminoácido, p.ej., aproximadamente entre una y diez modificaciones de aminoácido, aproximadamente entre una y cinco modificaciones de aminoácido, etc. con respecto al original. Por tanto, las secuencias de las variantes de Fc y las del polipéptido de Fc original son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias de la variante de Fc en la presente memoria poseerán aproximadamente un 80% de homología con respecto a la secuencia de variante de Fc original, p.ej., al menos aproximadamente un 90% de homología, al menos aproximadamente un 95% de homología, al menos aproximadamente un 98% de homología, al menos aproximadamente un 99% de homología, etc. Las modificaciones descritas en la presente memoria incluyen modificaciones de aminoácido, que incluyen inserciones, eliminaciones y sustituciones. Las modificaciones descritas en la presente memoria también incluyen modificaciones de la forma glico. Las modificaciones se pueden realizar genéticamente empleando biología molecular, o pueden realizarse enzimática o químicamente.

30 Las variantes de Fc descritas en la presente memoria se definen según las modificaciones de aminoácido que las componen. De esta manera, por ejemplo, S267E es una variante de Fc con la sustitución S267E con respecto al polipéptido de Fc original. Del mismo modo, S267E/L328F define una variante de Fc con las sustituciones S267E y L328F con respecto al polipéptido de Fc original. La identidad del aminoácido WT puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 267E/328F. Cabe destacar que el orden en que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, por ejemplo, 267E/328F es la misma variante de Fc que 328F/267E, etcétera. A menos que se indique lo contrario, las posiciones discutidas en la presente memoria se numeran de acuerdo al índice EU o al esquema de numeración de EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refieren a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85).

40 En determinadas realizaciones, las variantes de Fc descritas en la presente memoria están basadas en secuencias de IgG humana, y por tanto las secuencias de IgG humana se usan como secuencias "base" con las que comparar otras secuencias, que incluyen, aunque sin limitación, secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedores y primates. Las inmunoglobulinas también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgE, IgGD, IgGM, y similares. Se contempla que, aunque las variantes de Fc descritas en la presente memoria están diseñadas en el contexto de una IgG original de partida, las variantes se pueden diseñar o "transferir" al contexto de otra segunda IgG original. Esto se realiza determinando los residuos y las sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y la segunda IgGs, típicamente en base a la homología de secuencia o de estructura entre las secuencias de la primera y segunda IgGs. A fin de establecer homología, la secuencia de aminoácido de una primera IgG descrita en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Tras alinear las secuencias, usando uno o más programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando los residuos conservados entre especies), permitiendo las inserciones y eliminaciones necesarias para mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados por una eliminación e inserción arbitraria), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares de la secuencia primara de la primera inmunoglobulina. El alineamiento de residuos conservados puede conservar el 100% de dichos residuos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75%, o de tan solo el 50% de los residuos conservados, también es adecuado para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también pueden definirse determinando la homología estructural entre una primera y una segunda IgG que esté a nivel de estructura terciaria para IgGs cuyas estructuras hayan sido determinadas. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular del progenitor o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están a menos de aproximadamente 0,13 nm, tras el alineamiento. En otra realización, los residuos equivalentes están a menos de aproximadamente 0,1 nm tras el alineamiento. El alineamiento se alcanza tras haber orientado el mejor modelo y haberlo posicionado para dar lugar al máximo solapamiento de coordenadas atómicas de átomos de proteína diferentes de hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinen los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG original en

la que se preparan las IgGs, lo que se pretende explicar es que las variantes de Fc descubiertas en la presente memoria pueden ser modificadas para obtener una segunda IgG original que presenta una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de Fc. De este modo, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en el que el anticuerpo original es IgG1 humana, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para

5 determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede ser modificado para obtener otro anticuerpo IgG1 original que se une a un antígeno diferente, en un anticuerpo IgG2 original, en un anticuerpo original IgA humano, en un anticuerpo original IgG2a o IgG2b, y otros similares. Nuevamente, tal como se ha descrito anteriormente, el contexto de la variante de Fc original no afecta a la capacidad de transferir las variantes de Fc descritas en la presente memoria a otras IgGs originales.

10 Las variantes de Fc descritas en la presente memoria pueden optimizarse para una variedad de propiedades de unión de receptor de Fc. Una variante de Fc que es modificada, o que se predice, para presentar una o más propiedades optimizadas se denomina en la presente memoria "variante de Fc optimizada". Las propiedades que pueden optimizarse incluyen, aunque sin limitación, una afinidad potenciada o reducida por una FcγR. En una realización, las variantes de Fc descritas en la presente memoria están optimizadas para poseer una afinidad

15 mejorada por un receptor inhibitor FcγRIIb. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria proporcionan una afinidad mejorada por FcγRIIb, y además una afinidad reducida por uno o más FcγRs activantes, que incluyen por ejemplo FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR pueden expresarse sobre células de cualquier organismo, que incluyen, aunque sin limitación, humanos, monos cynomolgus y ratones. Las variantes de Fc descritas en la presente memoria pueden optimizarse para poseer una afinidad mejorada por

20 FcγRIIb humano.

Con "mayor afinidad" o "afinidad mejorada" o "afinidad potenciada" o "mejor afinidad" que un polipéptido de Fc original, tal como se usan en la presente memoria, se pretende indicar que una variante de Fc se une a un receptor de Fc con una constante de equilibrio de asociación (KA o Ka) significativamente mayor, o con una constante de equilibrio de disociación (KD o Kd) significativamente menor que el polipéptido de Fc original cuando las cantidades de polipéptido variante y original en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante de Fc con una afinidad de unión a receptor de Fc mejorada puede presentar entre aproximadamente 5 veces y

25 aproximadamente 1000 veces, p.ej. entre aproximadamente 10 veces y aproximadamente 500 veces, de mejora en la afinidad de unión a receptor de Fc en comparación con el polipéptido de Fc original, en donde la afinidad de unión de receptor de Fc se determina, por ejemplo, mediante métodos de unión descritos en la presente memoria, que incluyen, aunque sin limitación, Biacore, aplicados por un especialista en la técnica. Por consiguiente, con "afinidad reducida" en comparación con polipéptido de Fc original tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar que una variante de Fc se une a un receptor de Fc con una KA significativamente menor o con una KD significativamente mayor que el polipéptido de Fc. Una mayor afinidad o una afinidad reducida también se pueden definir con respecto a un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, según los datos de la presente memoria, la IgG1

30 WT (nativa) se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 1,5 μM, o de aproximadamente 1500 nM. Adicionalmente, algunas variantes de Fc descritas en la presente memoria se unen a FcγRIIb con una afinidad aproximadamente 10 veces mayor a IgG1 WT. Tal como se describe en la presente memoria, una afinidad mayor o potenciada significa que tiene una KD inferior a aproximadamente 100 nM, por ejemplo entre aproximadamente 10 nM – aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 nM – aproximadamente 100 nM, o menos de

35 aproximadamente 1 nM.

En una realización, las variantes de Fc proporcionan una afinidad selectivamente mejorada por FcγRIIb con respecto a uno o más receptores activantes. Afinidad selectivamente mejorada significa que la variante de Fc tiene una afinidad mejorada por FcγRIIb respecto a el(los) receptor(es) activante(s) en comparación con el polipéptido de Fc original, pero tiene una afinidad reducida por el(los) receptor(es) activante(s) en comparación el polipéptido de Fc original, o significa que la variante de Fc tiene una afinidad mejorada tanto por FcγRIIb como por el(los) receptor(es) activante(s) en comparación con el polipéptido de Fc original, sin embargo la mejora en la afinidad es mayor para FcγRIIb que por el(los) receptor(es) activante(s). En realizaciones alternativas, las variantes de Fc reducen o eliminan la unión a una o más proteínas de complemento, reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por FcγR, y/o reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por complemento.

45

50 La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγRs proporciona otro parámetro adicional que tiene un impacto en la utilidad terapéutica de las variantes de Fc descritas en la presente memoria. Mientras que la especificidad y la selectividad de una variante de Fc dada por las diferentes clases de FcγRs afecta significativamente a la capacidad de una variante de Fc para atacar a un antígeno dado para el tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o la selectividad de una variante de Fc por diferentes formas polimórficas de dichos receptores puede determinar en parte qué experimentos de investigación o pre-clínicos pueden ser apropiados para evaluación, y en definitiva que poblaciones de pacientes pueden responder o no al tratamiento. De esta manera, la especificidad o la selectividad de las variantes de Fc descritas en la presente memoria por los polimorfismos de receptor de Fc, que incluyen, aunque sin limitación, FcγRIIA, FcγRIIIa y similares, pueden usarse para guiar la selección de experimentos de investigación y pre-clínicos, el diseño de ensayos clínicos, la selección de pacientes, la dependencia de dosis y/u

55 otros aspectos relativos a los ensayos clínicos.

60

Las variantes de Fc descritas en la presente memoria pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con receptores de Fc diferentes a los FcγRs, que incluyen, aunque sin limitación, proteínas de

complemento, FcRn y homólogos de receptor de Fc (FcRHs). Los FcRHs incluyen, aunque sin limitación, FcRHI, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5 y FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190: 123-136).

Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante de Fc dada para tratar una enfermedad dada es el contexto de la variante de Fc. Así, la selectividad o la especificidad por receptor de Fc de una variante de Fc dada proporcionarán diferentes propiedades dependiendo de si está compuesta por un anticuerpo, una fusión de Fc, o variantes de Fc con una pareja de fusión acoplada. En una realización, una especificidad de receptor de Fc de la variante de Fc descrita en la presente memoria determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante de Fc dada para fines terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno diana y de la enfermedad o indicación a tratar. Para algunas dianas e indicaciones, una mayor afinidad por FcγRIIb y unas funciones efectoras mediadas por FcγR activante reducidas pueden ser beneficiosas. Para otros antígenos diana y aplicaciones terapéuticas, puede ser beneficioso aumentar la afinidad por FcγRIIb, o aumentar la afinidad tanto por FcγRIIb como por los receptores activantes.

Propiedades inhibitoras y métodos para inhibir células CD32b<sup>+</sup>

Los antígenos diana de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden expresarse en una variedad de tipos de células. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria son específicas de antígenos expresados en células CD32b<sup>+</sup>. Los tipos de células que pueden ser atacados por las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, células B, células de plasma, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos y eosinófilos. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden inhibir células CD32b<sup>+</sup> siendo dirigidas a un antígeno no expresado en células CD32b<sup>+</sup>. En algunas realizaciones, los antígenos diana incluyen aquellos que no son expresados por células CD32b<sup>+</sup>, pero que pueden ligarse a células CD32b<sup>+</sup>, p.ej., vía BCR. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las inmunoglobulinas pueden atacar un antígeno o alérgeno autoinmune. Los antígenos autoinmunes que pueden ser atacados por las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, proteínas y péptidos citrulinados tales como CCP-1, CCP-2 (péptidos citrulinados cíclicos), fibrinógeno, fibrina, vimentina, filagrina, péptidos de colágeno I y II, alfa-enolasa, factor de iniciación de la traducción 4G1, factor perinuclear, queratina, Sa (proteína vimentina citoesquelética), componentes de cartílago estructural tales como colágeno II, IX y XI, proteínas en suero circulante tales como RFs (IgG, IgM), fibrinógeno, plasminógeno, ferritina, componentes nucleares tales como RA33/hnRNP A2, Sm, factor de elongación de traducción eucariótico 1 alfa 1, proteínas de estrés tales como HSP-65, -70, -90, BiP, factores inflamatorios/inmunes tales como B7-H1, IL-1 alfa, e IL-8, enzimas tales como calpastatina, alfa-enolasa, aldolasa-A, dipeptidil peptidasa, osteopontina, glucosa-6-fosfato isomerasa, receptores tales como lipocortina 1, proteínas nucleares de neutrófilo tales como lactoferrina y proteína nuclear de 25-35 kD, proteínas granulares tales como proteína de aumento de la permeabilidad bactericida (BPI), elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, proteinasa 3, antígenos de plaqueta, antígeno de proteína mielina, antígeno de célula de isleta, factor reumatoide, histonas, proteínas P ribosómicas, cardiolipina, vimentina, ácidos nucleicos tales como dsADN, ssADN y ARN, partículas ribonucleares y proteínas tales como antígenos Sm (que incluyen, aunque sin limitación SmD's y SmBVB), U1 RNP, A2/B1 hnRNP, Ro (SSA), y antígenos La (SSB).

En la presente memoria se describen métodos para inhibir células CD32b<sup>+</sup> sin limitarse a ello. La Figura 3 es una representación esquemática de un mecanismo propuesto mediante el cual las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria inhiben células CD32b<sup>+</sup> (ver también el Ejemplo 3; véase también la Figura 3). Por consiguiente, en la presente memoria se describen métodos para inhibir células CD32b<sup>+</sup> que comprenden poner en contacto una célula CD32b<sup>+</sup> con una inmunoglobulina que comprende una región Fc con afinidad potenciada por FcγRIIb. En una realización, la inmunoglobulina se une a al menos dos proteínas de célula B, p.ej. al menos a proteínas ligadas sobre la superficie de células B. En una realización, la primera de dichas proteínas de célula B es FcγRIIb. En otra realización, la segunda de dichas proteínas de célula B es parte del complejo de receptor de célula B (BCR), que puede incluir un antígeno ligado a BCR. En otra realización, la segunda de dichas proteínas de célula B no está implicada directamente en el reconocimiento de antígenos. En otra realización, la segunda de dichas proteínas de célula B es expresada sobre la superficie de la célula B, pero no forma parte del receptor de célula B. Los ejemplos no limitativos de la segunda de dichas proteínas de célula B incluyen proteínas de BCR (p.ej., IgM ([μu]), CD79a, CD79b, CD19, CD21, CD22, CD72, CD81, Leu13, etc.), antígenos ligados al BCR (p.ej., autoantígenos, alérgenos, etc.), u otras proteínas ligadas a la superficie de las células B (p.ej., CD20, CD23, CD24, CD35, CD40, CD45RA, CD80, CD86, HLA- DR, etc.). En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas inhiben la liberación de calcio desde las células B tras su estimulación a través del receptor de célula B. En otra realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria se une a al menos dos proteínas de célula B sobre la superficie de la misma célula B (véase, p.ej., la Figura 3).

Modificaciones para optimizar la función inhibitora

La descripción de la presente memoria está dirigida a inmunoglobulinas que comprenden modificaciones, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad por el receptor FcγRIIb, y/o alteran la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en una o más funciones efectoras mediadas por FcγRIIb. Las modificaciones de la descripción incluyen modificaciones de aminoácido y modificaciones de la glicoforma.

Modificaciones de aminoácido

- Tal como se describe en la presente memoria (véase, p.ej., el Ejemplo 9), se puede usar un co-enfrentamiento simultáneo de alta afinidad de BCR cognado y FcγRIIB para inhibir células FcγRIIB+. Dicho co-enfrentamiento puede producirse a través del uso de una inmunoglobulina descrita en la presente memoria, p.ej., una inmunoglobulina usada para co-enfrentar FcγRIIB a través de su región de Fc, y un antígeno diana sobre la superficie de la célula FcγRIIB+ (p.ej., una o más proteínas de BCR cognadas y/o un antígeno ligado a un BCR cognado) a través de su región de Fv. Las modificaciones de aminoácido en las posiciones de la región constante de cadena pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332 permiten la modificación de las propiedades de unión a FcγRIIB de la inmunoglobulina, de función efectora y de las propiedades potencialmente clínicas de los anticuerpos.
- 5 En una realización, las inmunoglobulinas que se unen a células FcγRIIB+ y se co-enfrentan a un antígeno diana sobre la superficie celular y a un FcγRIIB sobre la superficie celular descritas en la presente memoria pueden ser inmunoglobulinas variantes con respecto a una inmunoglobulina original. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región de Fc variante, en donde dicha región de Fc variante comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región de Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región de Fc variante, en donde dicha región de Fc variante comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región de Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En una realización, la inmunoglobulina variante comprende una región de Fc variante, en donde dicha región de Fc variante comprende una o más (p.ej., dos o más) modificación(es) en comparación con una región de Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, en donde la numeración es según el índice EU.
- 10 En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234F, 234G, 234I, 234K, 234N, 234P, 234Q, 234S, 234V, 234W, 234Y, 234D, 234E, 235A, 235E, 235H, 235I, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 236A, 236E, 236N, 237A, 237E, 237H, 237K, 237L, 237P, 237Q, 237S, 237V, 237Y, 237D, 237N, 239D, 239E, 239N, 239Q, 265E, 266D, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 267L, 267N, 267Q, 267E, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298D, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327G, 327L, 327N, 327Q, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 329E, 330D, 330H, 330K, 330S, 331S, 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234N, 234F, 234D, 234E, 234W, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327L, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 330D, 330H, 330K y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) es al menos una sustitución (p.ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y, en donde la numeración es según un índice EU.
- 15 En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos modificaciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328 y 328/332, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos modificaciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dicha(s) modificación(es) son al menos dos sustituciones (p.ej., una combinación de sustituciones) seleccionadas del grupo que consiste en 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 234E/328F, 234W/239D, 234W/239E, 234W/267E, 234W/328Y, 235D/267E, 235D/328F, 235F/239D, 235F/267E, 235F/328Y, 235Y/236D, 235Y/239D, 235Y/267D, 235Y/267E, 235Y/268E, 235Y/328F, 236D/239D, 236D/267E, 236D/268E, 236D/328F, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 239D/268D, 239D/268E, 239D/327D, 239D/328F, 239D/328W, 239D/328Y, 239D/332E, 239E/267E, 266M/267E, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267E/327D, 267E/327E, 267E/328F, 267E/328I, 267E/328Y, 267E/332E, 268D/327D, 268D/328F, 268D/328W, 268D/328Y, 268D/332E, 268E/328F, 268E/328Y, 327D/328Y, 328F/332E, 328W/332E y 328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU.
- 20 En una realización, dicha(s) modificación(es) dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E,



Tal y como se describe en la presente memoria, los medios posicionales para optimizar la función efectora incluyen, aunque sin limitación, la modificación de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de cadena pesada (p.ej., en las posiciones: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332) que permiten la modificación de las propiedades de unión a FcγRIIb de la inmunoglobulina, la función efectora y potencialmente las propiedades clínicas de los anticuerpos.

En particular, los medios sustitucionales para optimizar las funciones efectoras de FcγRIIb, p.ej., alterando la afinidad por FcγRIIb, incluyen, aunque sin limitación, una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de cadena pesada, p.ej., uno o más de las sustituciones de aminoácido en las siguientes posiciones de la región constante de cadena pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. En una realización, los medios sustitucionales incluyen al menos una (p.ej., dos o más) sustitución(es) con respecto a una región de Fc original, en donde dicha(s) modificación(es) está(n) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, según el índice EU. En una realización, los medios sustitucionales incluyen una o más (p.ej., dos o más) sustitución(es) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, según el índice EU.

En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos una sustitución (p.ej., una o más sustitución(es), dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234F, 234G, 234I, 234K, 234N, 234P, 234Q, 234S, 234V, 234W, 234Y, 234D, 234E, 235A, 235E, 235H, 235I, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 236A, 236E, 236N, 237 A, 237E, 237H, 237K, 237L, 237P, 237Q, 237S, 237V, 237Y, 237D, 237N, 239D, 239E, 239N, 239Q, 265E, 266D, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298D, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327G, 327L, 327N, 327Q, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 329E, 330D, 330H, 330K, 330S, 331 S y 332E, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos una sustitución (p.ej., una o más sustitución(es), dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234N, 234F, 234D, 234E, 234W, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327L, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 330D, 330H, 330K y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos una sustitución (p.ej., una o más sustitución(es), dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E1 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y1, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos dos sustituciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328 y 328/332, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos dos sustituciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales son al menos dos sustituciones (p.ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 234E/328F, 234W/239D, 234W/239E, 234W/267E, 234W/328Y, 235D/267E, 235D/328F, 235F/239D, 235F/267E, 235F/328Y, 235Y/236D, 235Y/239D, 235Y/267D, 235Y/267E, 235Y/268E, 235Y/328F, 236D/239D, 236D/267E, 236D/268E, 236D/328F, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 239D/268D, 239D/268E, 239D/327D, 239D/328F, 239D/328W, 239D/328Y, 239D/332E, 239E/267E, 266M/267E, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267E/327D, 267E/327E, 267E/328F, 267E/328I, 267E/328Y, 267E/332E, 268D/327D, 268D/328F, 268D/328W, 268D/328Y, 268D/332E, 268E/328F, 268E/328Y, 327D/328Y, 328F/332E, 328W/332E y 328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU.

En una realización, dichos medios sustitucionales dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268 D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E,

268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239 D/268 E/328Y, 267A/268 D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU. En una realización, dichos medios sustitucionales dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R1 235W, 235Y, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 330L, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268 D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E.

En una realización, dichos medios sustitucionales dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F, en donde la numeración es según un índice EU.

En algunos aspectos de la descripción la inmunoglobulina comprende medios para modificaciones isotópicas, es decir, modificaciones en una IgG original de tipo aminoácido para obtener una IgG alternativa. Por ejemplo, tal como se ilustra en la Figura 2A, se puede construir una variante híbrida IgG1/IgG3 mediante medios sustitucionales para sustituir posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 por aminoácidos procedentes de IgG3 en las posiciones en las que los dos isotipos difieren. De esta manera, se puede construir un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprende uno o más medios sustitucionales, p.ej., 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otros aspectos de la descripción, se puede construir una variante híbrida IgG1/IgG2 mediante medios sustitucionales para sustituir posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 por aminoácidos procedentes de IgG1 en las posiciones en las que los dos isotipos difieren. De esta manera, se puede construir un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprende uno o más medios sustitucionales, p.ej., una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: 233E, 234L, 235L, -236G (que se refiere a una inserción de una glicina en la posición 236) y 327A.

#### Modificaciones de glicoforma

Muchos polipéptidos, que incluyen anticuerpos, son sometidos a una variedad de modificaciones post-traduccionales que implican resto de carbohidrato, tales como la glicosilación con oligosacáridos. Existen varios factores que pueden influir en la glicosilación. Se ha demostrado que la especie, el tejido y el tipo celular son todos importantes en la forma en que se produce la glicosilación. Adicionalmente el entorno extracelular, a través de condiciones de cultivo alteradas tales como la concentración en suero, puede tener un efecto directo sobre la glicosilación (Lifely et al., 1995, *Glycobiology* 5(8): 813-822).

Todos los anticuerpos contienen carbohidratos en posiciones conservadas de las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo presenta una variedad distinta de estructuras de carbohidrato N-ligadas. Aparte del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta un 30% de las IgGs humanas presentan una región Fab glicosilada. La IgG tiene un único carbohidrato biantenarico N-ligado en Asn297 del dominio CH2. Para IgG procedente de suero o producida ex vivo en hibridomas o en células modificadas genéticamente, la IgG es heterogénea en relación al carbohidrato ligado a Asn297 (Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59-76; Wright et al., 1997, *Trends Biotech* 15: 26-32). Para IgG humana, el oligosacárido básico normalmente consiste en GlcNAc2Man3GlcNAc, con diferentes números de residuos exteriores.

Los restos de carbohidrato de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria serán descritos en referencia a la nomenclatura usada habitualmente para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química de carbohidratos que emplea esta nomenclatura se encuentra en Hubbard et al. 1981, *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la notación abreviada NeuNAc, para ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNgc para ácido 5-glicolilneuramínico.

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos, p.ej., entre dos y hasta aproximadamente doce azúcares simples unidos) a una glicoproteína. Las cadenas laterales del oligosacárido normalmente están unidas a la cadena principal de la glicoproteína a través de enlaces de N o de O. Los oligosacáridos de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se producen generalmente unidos a un dominio CH2 de una región de Fc como oligosacáridos N-ligados. "Glicosilación N-ligada" se refiere a la unión del resto carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El especialista en la técnica reconocerá que, por ejemplo, cada uno de los dominios CH2 de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de ratón, así como de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanos, presentan un único sitio para la glicosilación N-ligada en el residuo de aminoácido 297 (Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991).

Para los fines de la presente memoria, una "estructura de carbohidrato básica madura" se refiere a una estructura de base de carbohidrato procesada unida a una región de Fc que generalmente que consiste en la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc(Fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)<sub>2</sub>, típica de oligosacáridos biantenarios. La estructura de carbohidrato básica madura se une a la región de Fc de la glicoproteína, generalmente a través de un enlace de N a Asn297 de un dominio CH2 de la región de Fc. Un "GlcNAc bisectante" es un residuo de GlcNAc unido a la [beta]1,4 manosa de la estructura de carbohidrato básica madura. El GlcNAc bisectante puede ser unido enzimáticamente a la estructura de carbohidrato básica madura mediante una enzima [beta](1,4)-N-acetilglucosaminil transferasa III (GnTIII). Las células CHO no expresan normalmente GnTIII (Stanley et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 261: 13370-13378), pero pueden ser modificadas para que lo hagan (Umana et al., 1999, *Nature Biotech.* 17: 176-180).

En la presente memoria se describen variantes de Fc que comprenden glicofomas modificadas o glicofomas diseñadas. Con "glicofoma modificada" o "glicofoma diseñada" tal como se usan en la presente memoria se pretende indicar una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una proteína original. Las glicofomas diseñadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen, aunque sin limitación, potenciar o reducir la función efectora mediada por FcγR. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria son modificadas para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectantes que están unidos covalentemente a la región de Fc.

En la técnica se conocen bien una serie de métodos para generar glicofomas modificadas (Umana et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473); (US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); (Potelligent(TM) technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMab(TM) glycosylation engineering technology [GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectantes que están unidos covalentemente a la región de Fc, por ejemplo expresando una IgG en varios organismos o líneas celulares, modificados o no (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células YB2/0 de hibridoma de rata), regulando enzimas implicadas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [[sigma]1,6-fucosiltransferasa] y/o 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando carbohidrato(s) después de que la IgG ha sido expresada. Otros métodos para modificar glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen usar cepas glicomodificadas de levadura (Li et al., 2006, *Nature Biotechnology* 24(2): 210-215), musgo (Nechansky et al., 2007, *Mol Immunol* 44(7): 1826-8) y plantas (Cox et al., 2006, *Nat Biotechnol* 24(12): 1591-7). El uso de un método particular para generar una glicofoma no pretende restringir las realizaciones de dicho método. Más bien, las realizaciones descritas en la presente memoria abarcan variantes de Fc con glicofomas modificadas, independientemente de cómo se hayan producido.

En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria están glicomodificadas para alterar el nivel de sialilación. Mayores niveles de glicanos de Fc sialilados en moléculas de inmunoglobulina G puede afectar de forma negativa a su funcionalidad (Scallon et al., 2007, *Mol Immunol.* 44(7): 1524-34), y diferencias en los niveles de sialilación de Fc pueden dar como resultado una actividad anti-inflamatoria modificada (Kaneko et al., 2006, *Science* 313: 670-673). Puesto que los anticuerpos pueden adquirir propiedades anti-inflamatorias tras sialilación del polisacárido básico de Fc, puede ser ventajoso glicomodificar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria para obtener un mayor o menor contenido de ácido siálico en Fc.

Glicofoma modificada habitualmente se refiere al diferente carbohidrato u oligosacárido; de esta manera, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma modificada. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la inmunoglobulina que comprende el diferente carbohidrato u oligosacárido. En una

realización, una composición descrita en la presente memoria comprende una variante de Fc glicosilada que presenta una región de Fc, en donde aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, p.ej., 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc. del anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que carece de fucosa. En otra realización, el anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que carece de fucosa y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región de Fc. En una realización alternativa, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región de Fc, en donde aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100% del anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que carece de ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que carece de ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región de Fc. En otra realización adicional, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región de Fc, en la que aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100% o 90-100% del anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que contiene ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo de la composición comprende una estructura de carbohidrato básica madura que contiene ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región de Fc. En otra realización, la combinación de la glicofoma modificada y la modificación de aminoácido proporciona unas propiedades óptimas de unión a receptor de Fc en el anticuerpo.

#### Otras modificaciones

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no están relacionadas específicamente a las funciones efectoras medias por FcγR o por complemento per se. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácido, o pueden ser modificaciones que se realizan enzimática o químicamente. Dicha(s) modificación(es) probablemente proporciona(n) alguna mejora en la inmunoglobulina, por ejemplo una mejora de su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. En la presente memoria se describe una variedad de mejoras que pueden realizarse acoplado las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria con modificaciones adicionales.

En una realización, la región variable de un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser madurada por afinidad, es decir, que se hayan realizado modificaciones de aminoácido en los dominios de VH y/o VL del anticuerpo para potenciar la unión del anticuerpo a su antígeno diana. Dichos tipos de modificaciones pueden mejorar las cinéticas de asociación y/o disociación de la unión al antígeno diana. Otras modificaciones incluyen aquellas que mejoran la selectividad por el antígeno diana frente a dianas alternativas. Éstas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad por antígeno expresado en células diana frente a células no diana. Otras mejoras en las propiedades de reconocimiento de dianas pueden ser proporcionadas por modificaciones adicionales. Dichas propiedades pueden incluir, aunque sin limitación, propiedades cinéticas específicas (es decir, cinética de asociación y disociación), selectividad por la diana particular frente a dianas alternativas, y selectividad por una forma especificada de diana frente a formas alternativas. Los ejemplos incluyen variantes de longitud completa frente a variantes de división, formas de superficie celular frente a formas solubles, selectividad por las diferentes variantes polimórficas, o selectividad por formas conformacionales específicas del antígeno diana. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan una internalización reducida o potenciada de una inmunoglobulina.

En una realización, las modificaciones se realizan para mejorar las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria, que incluyen, aunque sin limitación, la estabilidad, la solubilidad y el estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la inmunoglobulina, tal como proporcionar una mayor estabilidad, o la sustitución de aminoácidos no polares expuestos por aminoácidos polares, para obtener una mayor solubilidad. En el documento USSN 10/379.392 se describen una serie de metas y métodos de optimización que pueden ser útiles para diseñar modificaciones adicionales y optimizar adicionalmente las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también pueden combinarse con modificaciones adicionales que reduzcan el estado o el tamaño oligomérico, de tal modo que se mejore la penetración en el tumor, o que aumenten según se desee las tasas de eliminación in vivo.

Otras modificaciones de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen aquellas que permiten la formación específica de moléculas homodiméricas o homomultiméricas. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, disulfuros diseñados, así como modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar homodímeros u homomultímeros covalentes. Por ejemplo, los métodos para diseñar y las composiciones de dichas moléculas se describen en Kan et al., 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson et al., 2002, Recent Results Cancer Res. 159: 104-12; US 5.681.566; Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 y Shopes, 1992, J. Immunol. 148(9): 2918-22. Modificaciones adicionales a las variantes descritas en la presente memoria incluyen aquellas que permiten la formación específica de moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales y/o multifuncionales. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, una o más sustituciones de aminoácido en el dominio CH3, en el cual las sustituciones reducen la formación de homodímero y aumentan la formación de heterodímero. Por ejemplo, los métodos para diseñar y las composiciones de dichas moléculas se describen en Atwell et al., 1997, J. Mol. Biol. 270(1): 26-35 y Carter et al.,

2001, J. Immunol. Methods 248: 7-15. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios de bisagra y CH3, en los cuales las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

En realizaciones adicionales, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria comprenden modificaciones que eliminan sitios de degradación proteolítica. Éstas pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasa que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasa que degradan la proteína administrada in vivo. En una realización, se realizan modificaciones adicionales para eliminar sitios de degradación covalente, tal como desamidación (es decir, desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo), oxidación, y sitios de degradación proteolítica. Los sitios de desamidación que son particularmente útiles de eliminar son aquellos que presentan una elevada propensión a la desamidación, que incluyen, aunque sin limitación, los residuos de asparaginilo y glutamilo seguidos de glicinas (estructuras NG y QG, respectivamente). En dichos casos, la sustitución de cualquiera de los residuos puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Los sitios de oxidación habituales incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que pueden ser introducidas o eliminadas, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo y treonilo, la metilación de los grupos amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Modificaciones adicionales también pueden incluir, aunque sin limitación, modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación y fosforilación N-ligada u O-ligada.

Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran los rendimientos de expresión y/o purificación a partir de hospedantes o células hospedantes usadas habitualmente para la producción biológica. Éstas incluyen, aunque sin limitación, diversas líneas de células de mamífero (p.ej., CHO), líneas celulares de levadura, líneas celulares bacterianas y plantas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intercadena. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracadena.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colegas, que incluyen, aunque sin limitación, los métodos descritos en Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3 y Chin et al., 2003, Science 301 (5635): 964-7. En algunas realizaciones, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades funcionales, biofísicas, inmunológicas o de fabricación discutidas anteriormente. En realizaciones adicionales, estas modificaciones permiten modificaciones químicas adicionales para otros fines. En la presente memoria se contemplan otras modificaciones. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede estar ligada a una de una variedad de polímeros no proteínicos, p.ej., polietilén glicol (PEG), polipropilén glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilén glicol y polipropilén glicol. Se pueden hacer modificaciones de aminoácidos adicionales para permitir una modificación química o post-traducciona no específica de las inmunoglobulinas. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, la PEGilación y la glicosilación. Las sustituciones específicas que se pueden utilizar para permitir la PEGilación incluyen, aunque sin limitación, la introducción de nuevos residuos de cisteína o de aminoácidos no naturales, de tal modo que se pueden usar químicas de acoplamiento eficientes y específicas para unir PEG u otro resto polimérico. La introducción de sitios de glicosilación específicos se puede conseguir introduciendo nuevas secuencias N-X-T/S en las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia original a proteínas de MHC. Por ejemplo, las modificaciones de aminoácido serían diseñadas de tal modo que no haya ninguno, o un número mínimo, de epítopos inmunes que se predice que se unen, con elevada afinidad, a cualesquier alelos de MHC prevalentes. En la técnica se conocen varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en secuencias de proteínas y pueden usarse para clasificar epítopos en un anticuerpo descrito en la presente memoria. Véanse, por ejemplo, los documentos USSN 09/903.378, USSN 10/754.296, USSN 11/249.692, y las referencias citadas en los mismos.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden combinarse con inmunoglobulinas que alteran la unión de FcRn. Dichas variantes pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas a las inmunoglobulinas. En particular, las variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, aunque sin limitación: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L, 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A, 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S, 257C, 257M, 257L, 257N, 257Y, 279E, 279Q, 279Y, inserción de Ser después de 281, 283F, 284E, 306Y, 307V, 308F, 308Y 311 V, 385H, 385N, 204D, 284E, 285E, 286D y 290E.

En el alcance de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se incluyen modificaciones covalentes de anticuerpos, y generalmente, aunque no siempre, se realizan post-traduccionales. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácido específicos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N o C terminales.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los anticuerpos descritos en la presente memoria comprende la adición de una o más marcas. El término “grupo marcador” significa cualquier marca detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo a través de brazos espaciadores de longitudes diversas para reducir las potenciales dificultades estéricas. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y se pueden usar para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. En general, las marcas se clasifican en una variedad de clases, dependiendo del ensayo mediante el cual vayan a ser detectadas: a) marcas isotópicas, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcas magnéticas (p.ej., partículas magnéticas); c) restos redox activos; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (p.ej. peroxidasa de rábano,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítomos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p.ej., secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, etiquetas de epítomo, etc.). En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir problemas estéricos. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y se pueden usar para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Las marcas específicas incluyen colorantes ópticos, que incluyen, aunque sin limitación, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo los últimos específicos en muchos ejemplos. Los fluoróforos pueden ser fluoros de “molécula pequeña”, o fluoros proteínicos. Con “marca fluorescente” se pretende indicar cualquier molécula que se puede detectar por sus propiedades fluorescentes inherentes.

### Conjugados

En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria son “proteínas de fusión” de anticuerpo, a veces referidas en la presente memoria como “conjugados de anticuerpos”. La pareja de fusión o la pareja de conjugado pueden ser proteínicas o no proteínicas; generándose las últimas generalmente con grupos funcionales sobre el anticuerpo y sobre la pareja conjugada. Las parejas de conjugado y de fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de molécula pequeña y polipéptidos. Por ejemplo, en Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11: 584-588 se describe una variedad de conjugados de anticuerpo y métodos. Las posibles parejas de conjugado incluyen, aunque sin limitación, citoquinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas realizaciones, las parejas de conjugado se pueden concebir más como cargas, es decir, que la misión de un conjugado es la administración dirigida de la pareja de conjugado a una célula diana, por ejemplo, una célula cancerosa o una célula inmune, por parte de la inmunoglobulina. De esta manera, por tanto, la conjugación de una toxina a una inmunoglobulina busca la administración de dicha toxina a células que expresan el antígeno diana. Como apreciará el especialista en la técnica, en realidad los conceptos y definiciones de fusión y conjugado son solapantes. La designación de una fusión o conjugado no pretende restringirla a ninguna realización particular descrita en la presente memoria. Más bien, dichos términos se usan ampliamente para presentar el concepto amplio de que cualquier inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede ligarse genéticamente, químicamente, o de cualquier otra manera, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Los conjugados adecuados incluyen, aunque sin limitación, marcas como las descritas más adelante, fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, aunque sin limitación, fármacos citotóxicos (p.ej., agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de dichas toxinas. Las toxinas adecuadas y sus correspondientes fragmentos incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen compuestos radioquímicos preparados conjugando radioisótopos a anticuerpos, o uniendo un radionúclido a un agente quelante que ha sido unido covalentemente al anticuerpo. Realizaciones adicionales utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina y duocarmicinas y análogos; para las últimas véase el documento U.S. 2003/0050331.

En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria están fusionadas o conjugadas a una citoquina. Con “citoquina” tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et al., 2001, J. Immunol. Methods 248: 91-101, las citoquinas pueden fusionarse a un anticuerpo para proporcionar un sistema combinado con propiedades deseadas. Los ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monquinas y hormonas polipéptido tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana de N-metionilo, y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pro-relaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante de folículo (FSH), hormona estimulante de tiroide (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógeno placentar; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervio tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaqueta; factores de crecimiento transformantes (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonia (CSFs) tales como CSF de macrófago (M-CSF); CSF de granulocito-macrófago (GM-CSF); y CSF de granulocito (G-CSF); interleuquinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores de polipéptido que incluyen LIF y kit ligando (KL). Tal como se usa en la presente memoria, el término

citoquina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

En una realización alternativa, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria están fusionadas, conjugadas o ligadas operativamente a una toxina, que incluye, aunque sin limitación, toxinas de molécula pequeña y toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Por ejemplo, en Thrush et al., 1996, *Ann. Rev. Immunol.* 14: 49-71 se describe una variedad de inmunotoxinas y métodos de inmunotoxina. Las toxinas de molécula pequeña incluyen, aunque sin limitación, caliqueamicina, maitansina (US 5.208.020), tricoteno y CC1065. En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede estar conjugada a una o más moléculas de maitansina (p.ej., de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse en May-SS-Me, que puede ser reducida a May-SH3 y hacerse reaccionar con el anticuerpo modificado (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52: 127-131) para generar un conjugado de anticuerpo maitansinoide. Otro conjugado de interés comprende una inmunoglobulina conjugada a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir rupturas de ADN de cadena doble a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación,  $\gamma^1$ ,  $\alpha^2$ ,  $\alpha^3$ , N-acetyl- $\gamma^1$ , PSAG y [Theta]<sup>1</sup> (Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53: 3336-3342; Lode et al., 1998, *Cancer Research* 58: 2925-2928) (US 5.714.586; US 5.712.374; US 5.264.586; US 5.773). Los análogos de dolastatina 10 tales como la auristatina E (AE) y la monometilauristatina E (MMAE) pueden ser útiles como conjugados para las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria (Doronina et al., 2003, *Nat Biotechnol* 21 (7): 778-84; Francisco et al., 2003 *Blood* 102(4): 1458-65). Las toxinas enzimáticamente activas útiles incluyen, aunque sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (procedente de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 93/21232. Las realizaciones abarcan además un conjugado entre una inmunoglobulina descrita en la presente memoria y un compuesto con actividad nucleolítica, por ejemplo una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como desoxirribonucleasa (DNasa).

En una realización alternativa, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria se puede fusionar, conjugar o ligar operativamente a un radioisótopo para formar un radioconjugado. Se encuentran disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e isótopos radiactivos de Lu. Véase por ejemplo, la referencia.

En otra realización adicional, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en un pre-ataque tumoral, en donde el conjugado de inmunoglobulina-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no ligado de la circulación usando un agente de eliminación y después administrando un "ligando" (p.ej., avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (p.ej., un radionucleótido). En una realización alternativa, la inmunoglobulina está conjugada o ligada operativamente a una enzima a fin de emplear Terapia Profármaco Mediada por Enzima Dependiente de Anticuerpo (ADEPT). ADEPT se puede usar conjugando o ligando operativamente la inmunoglobulina a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (p.ej., un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento PCT WO 81/01145) en un fármaco anticancerígeno activo. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 88/07378 y el US 4.975.278. El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que se convierta en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el método descrito incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina útiles para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo; proteasa, tal como serrata proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contengan sustituyentes de aminoácido-D; enzimas de ruptura de carbohidrato tales como beta-galactosidasa y neuramimidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con alfa-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos descritos en la presente memoria en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, *Nature* 328: 457-458), se pueden preparar conjugados de inmunoglobulina-abzima para administración de la abzima a una población de células tumorales. Se contemplan una variedad de conjugados adicionales para las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. A continuación se describe una variedad de agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina-quinasa y otros agentes terapéuticos, que pueden ser útiles como conjugados de inmunoglobulina.

Las parejas de conjugado pueden estar ligadas a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en la presente memoria, que incluye los extremos N o C, o en algún residuo entre los extremos.

Una variedad de ligandos pueden ser útiles en las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria para unir covalentemente parejas de conjugado a una inmunoglobulina. Con "ligando", "secuencia ligando", "espaciador", "secuencia conectora" o los equivalentes gramaticales de los mismos, en la presente memoria se pretende indicar una molécula o grupo de moléculas (tal como un monómero o polímero) que conecta las dos moléculas y a menudo sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. En la técnica se conocen ligandos; por ejemplo, ligandos homo- o hetero-bifuncionales, como bien se sabe (véase, el catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, la sección técnica de agentes reticulantes, páginas 155-200). Se pueden usar una serie de estrategias para unir covalentemente moléculas. Éstas incluyen, aunque sin limitación, enlaces de polipéptido entre los extremos N y C de proteínas y dominios de proteína, enlaces de disulfuro, y enlace a través de reactivos reticulantes químicos. En un aspecto de esta realización, el ligando es un péptido de enlace, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido ligando puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácido: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido ligando debería tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal forma que asuman la conformación correcta una respecto a la otra, para que retengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácido. En una realización, el ligando tiene una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos, p.ej., un ligando puede tener una longitud de 1 a 20 aminoácidos. Los ligandos útiles incluyen polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (presentado en la SEQ ID NO: 1), (GGGGS)<sub>n</sub> (presentado en la SEQ ID NO: 2) y (GGGS)<sub>n</sub> (presentado en la SEQ ID NO: 3), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros ligandos flexibles, como apreciarán los especialistas en la técnica. Alternativamente, pueden ser útiles como ligandos una variedad de polímeros no proteínicos, que incluyen, aunque sin limitación, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietileno glicol y polipropileno glicol.

#### Producción de inmunoglobulinas

En la presente memoria también se describen métodos para producir y evaluar experimentalmente inmunoglobulinas. Los métodos descritos no pretenden limitar las realizaciones a ninguna aplicación particular ni a ninguna teoría de operación concreta. Más bien, los métodos proporcionados pretenden ilustrar de forma general que se puede producir una o más inmunoglobulinas y evaluarlas experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales de biología molecular, expresión, purificación y escrutinio de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5: 683-689; Maynard y Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-76; *Antibodies: A Laboratory Manual* de Harlow y Lane, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En una realización descrita en la presente memoria, se crean ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas, y que a continuación pueden ser clonados en células hospedantes, expresados y evaluados, si se desea. Por tanto, se pueden preparar ácidos nucleicos, y en particular ADN, que codifican cada secuencia proteínica. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden ser útiles para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se describen en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y en *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como apreciarán los especialistas en la técnica, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un número grande de secuencias es potencialmente costosa y necesita mucho tiempo. Con "biblioteca" en la presente memoria se pretende indicar un conjunto de variantes en cualquier forma, que incluyen, aunque sin limitación, una lista de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, una lista de sustituciones de ácido nucleico o de aminoácidos en posiciones variables, comprendiendo una biblioteca física ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes, tanto en forma purificada como no purificada. Por consiguiente, existe una variedad de técnicas que pueden usarse para generar de forma eficiente las bibliotecas descritas en la presente memoria. Dichos métodos que pueden ser útiles para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se describen o se referencia en los documentos US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, métodos de ensamblaje de genes, métodos basados en PCR y métodos que usan variaciones de PCR, métodos basados en reacción en cadena de ligasa, métodos oligo agrupados tales como los usados en el barajado sintético, métodos de amplificación con tendencia a error y métodos que usan oligos con mutaciones aleatorias, métodos de mutagénesis sito-dirigida clásicos, mutagénesis de casete, y otros métodos de amplificación y de síntesis de genes. Tal como se conoce en la técnica, existe una variedad de kits y métodos disponibles comercialmente para el ensamblaje de genes, mutagénesis, subclonación de vectores, y similares, y dichos productos comerciales son útiles para generar ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden ser producidas cultivando una célula hospedante transformada con ácido nucleico, p.ej., un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y de la célula hospedante, y serán fácilmente determinadas por el especialista en la técnica mediante experimentación rutinaria. Se puede usar una amplia variedad de células hospedantes apropiadas, que incluyen, aunque sin limitación, células de mamífero, bacterias, células de insecto, y levadura. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden ser útiles para

generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible en la American Type Culture Collection.

5 En una realización, las inmunoglobulinas son expresadas en sistemas de expresión de mamífero, que incluyen sistemas en los que se introducen las construcciones de expresión en las células de mamífero usando virus tales como retrovirus o adenovirus. Se puede usar cualquier célula de mamífero, p.ej., células humana, de ratón, rata, hámster y primate. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, que incluyen, aunque sin limitación, células Jurkat T, células NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, NSO, y variantes de las mismas. En una realización alternativa, se expresan proteínas de biblioteca en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacterianos son bien conocidos en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas son producidas en células de insecto (p.ej., Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (p.ej., *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). En una realización alternativa, las inmunoglobulinas son expresadas in vitro usando sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de traducción in vitro derivados de células tanto procarióticas (p.ej., *E. coli*) como eucarióticas (p.ej., germen de trigo, reticulocitos de conejo) se encuentran disponibles y pueden elegirse en base a los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los especialistas en la técnica, se requiere traducción in vitro para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación de ribosomas. Adicionalmente, las inmunoglobulinas pueden ser producidas mediante métodos de síntesis química. También con sistemas de expresión transgénicos tanto animales (p.ej., leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, lavas de insecto enteras, etc.) como vegetales (p.ej., maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.).

Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden incorporarse en un vector de expresión a fin de expresar la proteína. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteína. Los vectores de expresión pueden comprender vectores auto-replicantes extra-cromosómicos o vectores que se integran en un genoma hospedante. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula hospedante. De esta manera, los vectores de expresión que son útiles para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, aquellos que permiten la expresión de proteína en células de mamífero, bacterias, células de insecto, levadura, y en sistemas in vitro. Como es conocido en la técnica, se dispone de una variedad de vectores de expresión, comercialmente o de otra forma, que pueden ser útiles para expresar las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria.

30 Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína ligada operativamente a secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Con "ligado operativamente" en la presente memoria se pretende indicar que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional ligado operativamente al ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina, y típicamente son apropiados para la célula hospedante usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y parada transcripcional, secuencias de inicio y parada traduccional, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como es también conocido en la técnica, los vectores de expresión típicamente contienen un gen de selección o marcador para permitir la selección de células hospedantes transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedante utilizada.

Las inmunoglobulinas pueden ligarse operativamente a una pareja de fusión para permitir el ataque dirigido, la purificación, el escrutinio, la presentación, y similares, de la proteína expresada. Las parejas de fusión pueden unirse a la secuencia de inmunoglobulina a través de secuencias de enlace. La secuencia de enlace generalmente comprenderá un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar ligandos más largos. Típicamente, las secuencias de enlace se seleccionan para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los especialistas en la técnica, como ligandos se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias. Por ejemplo, una secuencia de enlace habitual comprende la secuencia de aminoácido GGGGS. Una pareja de fusión puede ser una secuencia de ataque dirigido o una secuencia señal que dirija la inmunoglobulina y cualesquier parejas de fusión asociadas hacia una localización celular deseada o al medio extracelular. Como es sabido en la técnica, determinadas secuencias de señalización puede atacar una proteína que va a ser secretada en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interior y la exterior de la célula. Una pareja de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o una proteína que permite la purificación y/o el escrutinio. Dichas parejas de fusión incluyen, aunque sin limitación, etiquetas de polihistidina (Histags) (por ejemplo, H6 y H10 y otras etiquetas para en sistemas de Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC) (p.ej., columnas de afinidad de  $Ni^{+2}$ )), fusiones GST, fusiones MBP, Strep-tag, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas de epítipo que están dirigidas por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, flag-tags, y similares). Como apreciarán los especialistas en la técnica, dichas etiquetas pueden ser útiles para purificación, para escrutinio, o para ambos. Por ejemplo, una inmunoglobulina puede ser purificada usando una His-tag inmovilizándola en una columna de afinidad  $Ni^{+2}$ , y después, tras purificación, se puede usar la misma His-tag para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta con  $Ni^{+2}$  para llevar a cabo un ensayo ELISA u otro ensayo de unión (tal como se describe más adelante). Una pareja de fusión puede permitir el uso de un método de selección para escrutar inmunoglobulinas (ver más adelante). Las

parejas de fusión que permiten una variedad de métodos de selección son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, fusionando los miembros de una biblioteca de inmunoglobulina a la proteína de gen III, se puede emplear presentación de fagos (Kay et al., Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10838; Smith, 1985, Science 228: 1315-1317). Las parejas de fusión pueden permitir el marcaje de las inmunoglobulinas. Alternativamente, una pareja de fusión se puede unir a una secuencia específica sobre el vector de expresión, permitiendo que la pareja de fusión y la inmunoglobulina asociada se unan covalentemente o no covalentemente con el ácido nucleico que las codifica. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células hospedantes son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula hospedante usada. Las técnicas incluyen, aunque sin limitación, la transfección mediada por calcio, la precipitación de fosfato cálcico, el tratamiento con cloruro cálcico, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la infección vírica o de fagos, la encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas, y la microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser temporal o estable.

En una realización, las inmunoglobulinas son purificadas o aisladas tras la expresión. Las proteínas se pueden aislar o purificar mediante una variedad de formas conocidas por los especialistas en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, ordenamiento o filtración en gel, y fase inversa, llevada a cabo a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, diálisis y de cromatografía. Las técnicas de ultrafiltración y de diafiltración, en conjunción con la concentración de proteína, también son útiles. Como es bien sabido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se unen a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden ser útiles para la purificación de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región de Fc. De igual modo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como por supuesto hace el antígeno diana del anticuerpo. La purificación a menudo puede ser facilitada por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden purificar usando resina de glutatona si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad Ni<sup>+2</sup> si se emplea una His-tag, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa una flag-tag. Para una guía general sobre las técnicas de purificación adecuadas, véase, p.ej., Protein Purification: Principles and Practice, 3ª Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará dependiendo del escrutinio o del uso de las inmunoglobulinas. En algunos casos no es necesaria purificación. Por ejemplo en una realización, si las inmunoglobulinas son secretadas, el escrutinio puede tener lugar directamente a partir del medio. Como es bien conocido en la técnica, algunos métodos de selección no implican purificación de proteínas. Por tanto, por ejemplo, si una biblioteca de inmunoglobulinas se convierte en una biblioteca de presentación de fago, puede no realizarse la purificación de proteínas.

#### Experimentación in vitro

Las inmunoglobulinas pueden ser sometidas a escrutinio usando una variedad de métodos, que incluyen aunque sin limitación aquellos que emplean ensayos in vitro, ensayos in vivo y ensayos basados en célula, y tecnologías de selección. Se puede utilizar automatización y tecnologías de escrutinio de alto rendimiento en los procedimientos de escrutinio. El escrutinio puede emplear el uso de una pareja de fusión o marca. El uso de parejas de fusión se ha discutido anteriormente. Con "marcado" en la presente invención se pretende indicar que las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria presentan uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un escrutinio. En general, las marcas entran dentro de tres clases: a) marcas inmunes, que pueden ser un epítipo incorporado como una pareja de fusión que es reconocida por un anticuerpo, b) marcas isotópicas, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, y c) marcas de molécula pequeña, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de marcaje. Las marcas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de proteínas.

En una realización, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas son escrutadas en un ensayo in vitro. Los ensayos in vitro pueden permitir un amplio rango dinámico para escrutar propiedades de interés. Las propiedades de inmunoglobulinas que pueden ser escrutadas incluyen, aunque sin limitación, estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos de Fc, por ejemplo FcγRs. Las múltiples propiedades se pueden escrutar simultánea o individualmente. Las proteínas pueden estar purificadas o sin purificar, dependiendo de los requerimientos del ensayo. En una realización, el escrutinio es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para la unión de inmunoglobulinas a una proteína o una molécula no proteínica que se sabe, o se piensa, que se une a la inmunoglobulina. En una realización, el escrutinio es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. En una realización alternativa, el escrutinio es un ensayo de unión de inmunoglobulinas a un ligando de Fc, que incluye, aunque sin limitación la familia de FcγRs, el receptor neonatal FcRn, la proteína de complemento C1q, y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos de Fc pueden proceder de cualquier organismo. En una realización, los ligandos de Fc son de humanos, ratones, ratas, conejos y/o monos. Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen aunque sin limitación ensayos basados en FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) y BRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminescente Amplificado), Ensayo de Proximidad de Centelleo, ELISA (Ensayo Inmunsorbente Ligado a Enzima), SPR (Resonancia de Plasmón Superficial, también conocida como BIACORE®), calorimetría de valoración isoterma, calorimetría de

barrido diferencial, electroforesis de gel y cromatografía que incluye filtración en gel. Éstos y otros métodos pueden aprovechar alguna pareja de fusión o marca de la inmunoglobulina. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, aunque sin limitación, marcas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas.

5 Las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas, por ejemplo la estabilidad y la solubilidad, pueden ser  
 10 escrutadas usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de la proteína se puede  
 determinar midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desplegado. Por ejemplo, las  
 inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se pueden desplegar usando desnaturizantes químicos, calor  
 o pH, y dicha transición se puede monitorizar usando métodos que incluyen, aunque sin limitación, espectroscopía  
 15 de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de RMN,  
 calorimetría y proteólisis. Como apreciarán los especialistas en la técnica, los parámetros cinéticos de las  
 transiciones de plegamiento y desplegamiento también se pueden monitorizar usando éstas y otras técnicas. La  
 solubilidad y la integridad estructural global de una inmunoglobulina pueden determinarse cuantitativa o  
 20 cualitativamente usando un amplio rango de métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos que pueden  
 encontrar uso para caracterizar las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria  
 incluyen la electroforesis de gel, el enfoque isoelectrico, la electroforesis capilar, cromatografía tal como  
 cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de líquidos de alta  
 resolución de fase inversa, mapeado de péptidos, mapeado de oligosacáridos, espectroscopía de fluorescencia,  
 25 espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de valoración isoterma, calorimetría de barrido diferencial, ultra-  
 centrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, proteólisis, y reticulamiento, medida de turbidez, ensayos de  
 retardo de filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión de colorante fluorescente, ensayos de tinción de  
 proteína, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. También puede ser útil el  
 análisis estructural empleando técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de RMN. En una realización, la  
 30 estabilidad y/o la solubilidad se pueden medir determinando la cantidad de disolución de proteína tras un periodo de  
 tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede ser expuesta o no a alguna condición extrema, por ejemplo  
 temperatura elevada, pH bajo, o la presencia de un desnaturizante. Puesto que la función típicamente requiere una  
 proteína estable, soluble y/o bien estructurada/plegada, los ensayos funcionales y de unión mencionados  
 anteriormente también proporcionan métodos para llevar a cabo dicha medición. Por ejemplo, una disolución que  
 comprende una inmunoglobulina podría ser evaluada para determinar su capacidad para unirse a un antígeno diana,  
 a continuación ser expuesta a una temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos, después  
 ser evaluada nuevamente en un ensayo de unión a antígeno. Puesto que no es de esperar que la proteína  
 desplegada y agregada sea capaz de unirse a antígeno, la cantidad de actividad remanente proporciona una medida  
 de la estabilidad y solubilidad de la inmunoglobulina.

En una realización, la biblioteca es escrutada usando uno o más ensayos basados en célula o in vitro. Para dichos  
 35 ensayos, las inmunoglobulinas, purificadas o sin purificar, típicamente son añadidas exógenamente de tal modo que  
 las células son expuestas a variantes individuales o a grupos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos  
 ensayos se basan típicamente, aunque no siempre, en la biología de la capacidad de la inmunoglobulina para unirse  
 al antígeno diana y para mediar en algún evento bioquímico, por ejemplo en funciones efectoras como la lisis celular,  
 la fagocitosis, la inhibición de la unión ligando/receptor, la inhibición de crecimiento y/o proliferación, la apoptosis y  
 40 similares. Dichos ensayos a menudo implican la monitorización de la respuesta de las células a la inmunoglobulina,  
 por ejemplo la supervivencia celular, la muerte celular, la fagocitosis celular, la lisis celular, el cambio en la  
 morfología celular, o la activación transcripcional tal como la expresión celular de un gen natural o de un gen  
 indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de las inmunoglobulinas para producir ADCC,  
 ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, es decir,  
 45 además de las células diana, por ejemplo complemento de suero, o células efectoras tales como monocitos  
 sanguíneos periféricos (PBMCs), células NK, macrófagos, y similares. Dichas células adicionales pueden proceder  
 de cualquier organismo, p.ej., humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los anticuerpos reticulados o  
 monoméricos pueden producir la apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan el antígeno diana del  
 anticuerpo, o pueden mediar en el ataque a células diana por parte de células inmunes que hayan sido añadidas al  
 50 ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte celular o la viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen  
 el uso de colorantes, fluoróforos, reactivos inmunoquímicos, citotoxícos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de  
 caspasa o de conjugados anexina-fluor pueden facilitar la medición de la apoptosis, y la captación o liberación de  
 sustratos radiactivos (p.ej., ensayos de liberación basados en Cromo-51) o la reducción metabólica de colorantes  
 fluorescentes tales como azul alamar, pueden permitir la monitorización del crecimiento celular, la proliferación o la  
 55 activación celular. En una realización, se usa el ensayo de citotoxicidad DELF-IA® basado en EuTDA (Perkin Elmer,  
 MA). Alternativamente, se pueden monitorizar las células muertas o dañadas midiendo la liberación de una o más  
 proteínas intracelulares, por ejemplo lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir  
 como método para evaluar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede  
 monitorizarse evaluando genes o proteínas naturales que pueden ser regulados al alza o a la baja, por ejemplo se  
 60 puede medir la liberación de determinadas interleuquinas, o alternativamente se puede obtener una lectura a través  
 de una construcción de luciferasa o de GFP-indicador. Los ensayos basados en célula también pueden implicar la  
 medición de cambios morfológicos de células en respuesta a la presencia de una inmunoglobulina. Los tipos de  
 células para dichos ensayos pueden ser procarióticos o eucarióticos, y en la técnica se conoce una variedad de  
 líneas celulares que se pueden emplear. Alternativamente, los escrutinios basados en célula se llevan a cabo

usando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas.

Los ensayos in vitro incluyen, aunque sin limitación, ensayos de unión, ADCC, citotoxicidad CDC1, proliferación, liberación de peróxido/ozono, quimiotaxis de células efectoras, inhibición de dichos ensayos por anticuerpos de función efectora reducida; rangos de actividades tales como >100x de mejora o >100x de reducción, mezclas de activación de receptor y los resultados de ensayo que se esperan de dichos perfiles de receptor.

#### Experimentación in vivo

Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden caracterizarse en experimentos de célula, tejido y organismo completo. Como es sabido en la técnica, a menudo se ensayan fármacos en animales, que incluyen, aunque sin limitación, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir una eficacia de fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética del fármaco, la toxicidad y otras propiedades. Dichos animales como definirse como modelos de enfermedad. Con respecto a las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria, un reto particular surge cuando se usan modelos de animal para evaluar el potencial para la eficacia en humanos de polipéptidos candidatos – esto es debido, al menos en parte, al hecho de que las inmunoglobulinas que presentan un efecto específico sobre la afinidad por un receptor de Fc humano pueden no tener un efecto de afinidad similar con el receptor de animal ortólogo. Estos problemas pueden exacerbarse adicionalmente por las ambigüedades inevitables asociadas a la correcta asignación de ortólogos verdaderos (Mechetina et al., Immunogenetics, 2002, 54: 463-468), y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal (p.ej., los humanos poseen un FcγRIIIa pero los ratones no). A menudo los agentes terapéuticos son ensayados en ratones, que incluyen, aunque sin limitación, las cepas de ratón NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y transgénicos (que incluyen bloqueados y activados). Dichos ratones pueden desarrollar diversas afecciones autoinmunes que se asemejan a las patologías humanas de enfermedad autoinmune o inflamatoria sistémica específica de órgano, tales como el lupus sistémico eritematoso (SLE) y la artritis reumatoide (RA). Por ejemplo, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria destinada a enfermedades autoinmunes puede ser evaluada en dichos modelos de ratón tratando los ratones para determinar la capacidad de la inmunoglobulina para reducir o inhibir el desarrollo de la patología de enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el sistema de receptor de Fcγ de ratón y humano, una estrategia alternativa es usar un modelo SCID de ratón en el que ratones deficientes inmunes son injertados con PBLs o PBMCs humanas (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) proporcionando un sistema inmune humano semi-funcional con células efectoras y receptores de Fc. En dicho modelo, una exposición a antígeno (tal como toxoide de tétanos) activa las células B para diferenciarse en células de plasma y secretar inmunoglobulinas, reconstituyendo de este modo una inmunidad humoral específica del antígeno. Por tanto, se puede evaluar una inmunoglobulina dirigida dual descrita en la presente memoria que se une específicamente a un antígeno (tal como CD19 o CD79a/b) y FcγRIIIb en células B para examinar la capacidad de inhibir específicamente la diferenciación de células B. Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha inmunoglobulina para ser usada como agente terapéutico. También se pueden usar otros organismos para la evaluación, p.ej., mamíferos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por tanto se pueden usar para evaluar la eficacia, la toxicidad y la farmacocinética, u otra propiedad, de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. En último extremo, se requieren ensayos de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria en humanos para la aprobación de los fármacos, y por lo tanto dichos experimentos por supuesto son contemplados. De este modo, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden evaluarse en humanos para determinar su eficacia terapéutica, su toxicidad, su farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden conferir una actuación superior en agentes terapéuticos que contienen Fc en modelos de animal o en humanos. Los perfiles de unión a receptor de dichas inmunoglobulinas, tal como se describen en esta especificación, pueden, por ejemplo, seleccionarse para aumentar la potencia de los fármacos citotóxicos o para atacar a funciones efectoras específicas o células efectoras para mejorar la selectividad de la acción del fármaco. Además, los perfiles de unión de receptor se pueden seleccionar de tal modo que reduzcan en parte o totalmente las funciones efectoras, reduciendo con ello los efectos secundarios o la toxicidad de dicho fármaco que contiene Fc. Por ejemplo, una inmunoglobulina con una unión reducida a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIIa puede seleccionarse para eliminar la mayoría parte de la función efectora mediada por célula, o una inmunoglobulina con una unión reducida a C1q puede seleccionarse para limitar las funciones efectoras mediadas por complemento. En algunos contextos, se sabe que dichas funciones efectoras tienen potenciales efectos tóxicos. Por lo tanto, su eliminación puede aumentar la seguridad del fármaco portador de Fc y dicha seguridad mejorada puede caracterizarse en modelos de animal. En algunos contextos, se sabe que dichas funciones efectoras median en la actividad terapéutica de forma deseable. Por tanto, potenciarlas puede aumentar la actividad o potencia del fármaco portador de Fc y dicha actividad o potencia mejoradas se pueden caracterizar en modelos de animales.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden evaluarse para determinar su eficacia en modelos de animal clínicamente relevantes de varias enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos relevantes incluyen varios animales transgénicos para antígenos y receptores específicos.

Los modelos transgénicos relevantes tales como los que expresan receptores de Fc humanos (p.ej., CD32b) podrían usarse para evaluar y probar las inmunoglobulinas y las fusiones de Fc en términos de eficacia. La evaluación de las inmunoglobulinas mediante la introducción de genes humanos que median, directa o indirectamente, en la función efectora en ratones u otros roedores puede posibilitar estudios fisiológicos de eficacia en trastornos autoinmunes y RA. Los receptores de Fc humanos, tales como FcγRIIb pueden poseer polimorfismos tales como el del promotor génico (-343 de G a C) o el del dominio transmembrana de receptor 187 I o T, que posibilitarían adicionalmente la introducción de polimorfismos específicos y combinaciones de polimorfismos humanos en roedores. Los diversos estudios que implican FcRs específicos de polimorfismo no se limitan a esta sección, sino que abarcan todas las discusiones y aplicaciones de FcRs en general según se especifican a través de esta aplicación. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden conferir una actividad superior en fármacos que contienen Fc para dichos modelos transgénicos, en particular las variantes con perfiles de unión optimizados para actividad mediada por FcγRIIb pueden presentar una actividad superior en ratones transgénicos CD32b. Se pueden observar mejoras similares de la eficacia en ratones transgénicos para los demás receptores de Fc humanos, p.ej. FcγRIIa, FcγRI, etc., para inmunoglobulinas con perfiles de unión optimizados para los respectivos receptores. Los ratones transgénicos para múltiples receptores humanos mostrarían una actividad mejorada para inmunoglobulinas con perfiles de unión optimizados para los correspondientes receptores múltiples.

Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas al uso de modelos animales para caracterizar la eficacia potencial de anticuerpos terapéuticos candidatos en un paciente humano, algunos polipéptidos variantes descritos en la presente memoria pueden encontrar utilidad como representantes para determinar la potencial eficacia en humanos. Dichas moléculas representativas puede imitar – en el sistema animal – el FcR y/o la biología de complemento de una correspondiente inmunoglobulina humana candidata. Esta imitación muy probablemente se manifiesta a través de afinidades de asociación relativas entre inmunoglobulinas específicas y receptores de animal contra humano. Por ejemplo, si uno estuviera usando un modelo de ratón para determinar la eficacia potencial en humanos de una variante de Fc que presenta una afinidad reducida por el FcγRIIb humano inhibidor, una variante representante apropiada tendría una afinidad reducida por FcγRII de ratón. También cabe destacar que las variantes de Fc de representante podrían ser creadas en el contexto de una variante de Fc humana, de una variante de Fc animal, o de ambas.

En una realización, la evaluación de inmunoglobulinas puede incluir el estudio de la eficacia en primates (p.ej., modelo de mono cynomolgus) para facilitar la evaluación del agotamiento de células diana específicas que albergan el antígeno diana. Otros modelos de primate incluyen, aunque sin limitación, el uso de mono Rhesus para evaluar polipéptidos de Fc en estudios terapéuticos de enfermedad autoinmune, trasplante y cáncer.

Se llevan a cabo estudios de toxicidad para determinar efectos relativos a anticuerpos o fusión-Fc que no pueden ser evaluados en perfiles farmacológicos estándar, o que se producen solo tras una administración repetida del agente. La mayor parte de los tests de toxicidad se llevan a cabo en dos especies – un roedor y un no roedor – para asegurar que no se obvia ningún efecto adverso no esperado antes de introducir nuevas entidades terapéuticas en humanos. En general, estos modelos pueden medir una variedad de toxicidades que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductiva/de desarrollo y carcinogenicidad. En los anteriores parámetros se incluye la medición estándar de consumo de alimentos, peso corporal, formación de anticuerpos, química clínica, y examen macro y microscópico de órganos/tejidos estándar (p.ej., cardiotoxicidad). Otros parámetros adicionales de la medida son el trauma en el sitio de inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si los hubiera. Tradicionalmente, los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales, desnudos o conjugados, son evaluados en términos de reactividad cruzada con tejidos normales, producción de inmunogenicidad/anticuerpos, toxicidad de conjugados o ligandos y toxicidad de “espectador” de especies radiomarcadas. No obstante, dichos estudios pueden tener que ser individualizados para abordar preocupaciones específicas y siguiendo el conjunto de guías de ICH S6 (estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también indicado anteriormente). Como tal, los principios generales son que los productos estén suficientemente bien caracterizados, que se hayan eliminado impurezas/contaminantes, que el material de ensayo sea comparable a lo largo del desarrollo, que la aceptación de GLP se mantenga.

La farmacocinética (PK) de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se pueden estudiar en una variedad de sistemas de animal, siendo el más relevante los primates no humanos, tal como monos cynomolgus y Rhesus. Administraciones individuales o repetidas i.v./s.c. en un rango de dosis de 6000 veces (0,05-300 mg/kg) pueden ser evaluadas para determinar la vida media (de días a semanas) usando la concentración en plasma y la tasa de eliminación. El volumen de distribución en régimen estacionario y el nivel de absorción sistémica también se pueden medir. Los ejemplos de dichos parámetros de medición generalmente incluyen la concentración en plasma observada máxima (C<sub>max</sub>), el tiempo para alcanzar la C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>), el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde tiempo 0 hasta infinito [AUC(0-inf)] y la vida media de eliminación aparente (T<sub>1/2</sub>). Otros parámetros medidos podrían incluir el análisis compartimentado de datos concentración-tiempo obtenidos tras administración i.v. y la biodisponibilidad. Se han establecido ejemplos de estudios farmacológicos/toxicológicos con monos cynomolgus para Rituxan y Zevalin en los que los anticuerpos monoclonales para CD20 reaccionan de forma cruzada. También se pueden realizar estudios de biodistribución (para anticuerpos radiomarcados), dosimetría y PK en modelos de roedores. Dichos estudios evaluarían la tolerancia a todas las dosis administradas, la toxicidad en tejidos locales, la localización preferencial en modelos de animal de xenoinjerto de roedor y el agotamiento de células diana (p.ej., células CD20 positivas).

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden conferir una farmacocinética superior sobre los agentes terapéuticos que contienen Fc en sistemas de animales o en humanos. Por ejemplo, el aumento de la unión a FcRn puede incrementar la vida media y la exposición del fármaco que contiene Fc. Alternativamente, una reducción de la unión a FcRn puede disminuir la vida media y la exposición del fármaco que contiene Fc en los casos en los que una exposición reducida es favorable, tal como cuando dicho fármaco presenta efectos secundarios.

En la técnica es conocido que el conjunto de receptores de Fc se expresa diferencialmente en los diversos tipos de células inmunes, así como en los diferentes tejidos. La distribución de tejido diferencial de receptores de Fc finalmente puede tener un impacto en las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Puesto que las inmunoglobulinas de la presentación tienen afinidades variables por el conjunto de receptores de Fc, un escrutinio adicional de los polipéptidos en función de sus propiedades PD y/o PK puede ser extremadamente útil para definir el equilibrio óptimo de PD, PK y eficacia terapéutica conferidas por cada polipéptido candidato.

Los estudios farmacodinámicos pueden incluir, aunque sin limitación, el ataque a células específicas o el bloqueo de mecanismos de señalización, la medición de la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno, etc. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden ser dirigidas a poblaciones de células efectoras particulares, y con ello dirigir los fármacos que contienen Fc para inducir determinadas actividades para mejorar la potencia o para aumentar la penetración en un compartimento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad y localización de neutrófilos pueden ser el objetivo de una inmunoglobulina dirigida a FcγRIIIb. Dichos efectos farmacodinámicos pueden demostrarse en modelos de animales o en humanos.

#### Uso clínico

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden encontrar utilidad en un amplio abanico de productos. En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria es un reactivo terapéutico, diagnóstico o de investigación. Las inmunoglobulinas pueden encontrar utilidad en una composición que es monoclonal o policlonal. Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden usarse con fines terapéuticos. Como apreciarán los especialistas en la técnica, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden usarse para cualquier fin terapéutico para que el que se pueden usar anticuerpos, y similares. Las inmunoglobulinas pueden administrarse a un paciente para tratar trastornos que incluyen, aunque sin limitación, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades infecciosas y cáncer.

Un "paciente" para los propósitos descritos en la presente memoria incluye tanto humanos como otros animales, p.ej., otros mamíferos. De esta manera, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria tienen aplicaciones tanto de terapia como de veterinaria. El término "tratamiento" o "tratado" tal como se describe en la presente memoria pretende incluir tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o supresivas para una enfermedad o trastorno. De esta manera, por ejemplo, la administración exitosa de una inmunoglobulina antes de la aparición de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como ejemplo adicional, la administración exitosa de una inmunoglobulina optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratado" también abarcan la administración de una inmunoglobulina optimizada después de la aparición de la enfermedad a fin de erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un agente después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas clínicos y quizás de la remisión de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos que "necesitan el tratamiento" incluyen mamíferos que ya presentan la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a presentar la enfermedad o trastorno, incluyendo aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad o trastorno.

En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria es administrada a un paciente que tiene una enfermedad que implica la expresión inapropiada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance descrito en la presente memoria, se pretende que incluya enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes, debido por ejemplo a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, una localización de proteína, una modificación post-traducciona, un estado conformacional, la presencia de una proteína mutante o patógena, etc. De forma similar, la enfermedad o trastorno puede caracterizarse por alteraciones moleculares que incluyen, aunque sin limitación, polisacáridos y gangliosidos. Una sobreabundancia puede deberse a cualquier causa, que incluye, aunque sin limitación, la sobreexpresión a nivel molecular, la apariencia prolongada y acumulada en el sitio de acción, o el aumento de actividad de una proteína con respecto a lo normal. Dentro de esta definición se incluyen enfermedades y trastornos que se caracterizan por una reducción de una proteína. Esta reducción puede deberse a cualquier causa, incluyendo, aunque sin limitación la expresión reducida a nivel molecular, formas mutantes de una proteína, o una actividad reducida de una proteína con respecto a lo normal. Dicha sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse con respecto a la expresión, apariencia o actividad normal de una proteína, y dicha medida puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y/o evaluación clínica de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria.

"Cáncer" y "canceroso" en la presente memoria se refieren, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin

limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (que incluye liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o malignidades linfoides.

Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen malignidades hematológicas, tales como linfoma de Hodgkin, los linfomas no de Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoides, linfoma de célula de manto, linfoma folicular, linfoma de célula B grande difusa, linfoma de zona marginal, leucemia de célula peluda y leucemia linfoplasmacítica), tumores de células precursoras de linfocito, que incluyen la leucemia/linfoma linfoblástico agudo de célula B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de célula T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, que incluye leucemias de célula T periférica, leucemia de célula T adulto/linfomas de célula T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de célula de Langerhans, neoplasias mieloides tales como leucemias mielogenosas agudas, que incluyen AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia de promielocito aguda, leucemia mielomonocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, que incluyen leucemia mielógena crónica; tumores del sistema nervioso central tales como glioma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma; tumores sólidos de la cabeza y el cuello (p.ej., cáncer nasofaríngeo, carcinoma de glándula salivar y cáncer esofágico), cáncer de pulmón (p.ej., cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), sistema digestivo (p.ej., cáncer gástrico o de estómago, que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer del conducto biliar o del tracto biliar, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal y carcinoma anal), cáncer del sistema reproductor (p.ej., cáncer testicular, de pene o de próstata, cáncer uterino, vaginal, de la vulva, de la cerviz, de ovario y endometrial), de piel (p.ej., melanoma, carcinoma de célula basal, cáncer de célula escamosa, queratosis actínica), de hígado (p.ej., cáncer hepático, carcinoma hepático, cáncer hepatocelular y hepatoma), óseo (p.ej., osteoclastoma y cánceres óseos osteolíticos), de otros tejidos y órganos (p.ej., cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer del peritoneo y sarcoma de Kaposi), y tumores del sistema vascular (p.ej., angiosarcoma y hemangiopericitoma).

“Enfermedades autoinmunes” en la presente memoria incluye rechazo de injerto de isleta alogénica, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome anti fosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, autoanticuerops citoplásmicos antineutrófilo (ANCA), enfermedades autoinmunes de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, neutropenia autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, urticaria autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia de factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto-contrahospedante (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenia con mediación inmune, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conectivo mixta, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgaris, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, poli-croniditis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia, cirrosis biliar primaria, soriasis, artritis sorriática, fenómeno de Reynauld, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjorgen, rechazo de trasplante de órgano sólido, síndrome de rigidez, lupus eritematoso sistémico, arteritis de takayasu, arteritis temporal / arteritis de célula gigante, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiformis dermatitis, vitiligo y granulomatosis de Wegner.

“Trastornos inflamatorios” en la presente memoria incluyen síndrome de estrés respiratorio agudo (ARDS), artritis séptica aguda, artritis adyuvante (Prakken et al., Springer Semin Immunopathol., 2003 Ago; 25(1): 47-63), artritis idiopática juvenil (de Kleer et al., Arthritis Rheum. 2003 Jul; 47(7): 2001-10), encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, alergia, asma, aterosclerosis, inflamación crónica debida a infecciones bacterianas o víricas crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad arterial crónica, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, osteolisis inflamatoria, inflamación asociada a reacciones de hipersensibilidad aguda y retardada, inflamación asociada a tumores, lesión de nervio periférico o enfermedades desmielinizantes, inflamación asociada a trauma de tejido tal como quemaduras e isquemia, inflamación debida a meningitis, síndrome de lesión múltiple de órganos, fibrosis pulmonar, sepsis y choque séptico, síndrome de Stevens-Johnson, artropatía no diferenciada y espondiloartropatía no diferenciada.

Algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias que pueden ser atacadas por las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen el lupus sistémico eritematoso, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren, la esclerosis múltiple, la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), la enfermedad de Graves, la enfermedad inflamatoria del intestino, la soriasis, la diabetes de tipo I y el asma.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden utilizarse para modular la actividad del sistema inmune, y en algunos casos para imitar los efectos de la terapia de IVIg de un modo más controlado, específico y eficiente. Así, loas inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden usarse como agentes terapéuticos inmunomoduladores. IVIg es efectivamente una dosis elevada de inmunoglobulinas administradas intravenosamente. En general, IVIg se ha usado para regular a la baja afecciones autoinmunes. Se ha propuesto la hipótesis de que el mecanismo terapéutico de acción de la IVIg implica la ligación de receptores de Fc con una

elevada frecuencia (J. Bayry et al., 2003, *Transfusion Clinique et Biologique* 10: 165-169; Binstadt et al., 2003, *J Allergy Clin. Immunol.*, 697-704). De hecho, modelos animales de púrpura trombocitopénica (ITP) muestran que el Fc aislado es la porción activa de la IVIg (Samuelsson et al, 2001, *Pediatric Research* 50(5), 551). Para uso en terapia, las inmunoglobulinas son recolectadas de entre miles de donantes, con todos los problemas concomitantes asociados a agentes bioterapéuticos no recombinantes recolectados de humanos. Una inmunoglobulina descrita en al presente memoria realiza todas las funciones de la IVIg, pero es fabricada como una proteína recombinante en lugar de ser recolectada de donantes.

Los efectos inmunomoduladores de la IVIg pueden ser dependientes de la interacción productiva con uno o más ligandos de Fc, que incluyen, aunque sin limitación, FcγRs, proteínas de complemento y FcRn. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden usarse para promover actividad anti-inflamatoria (Samuelsson et al., 2001, *Science* 291: 484-486) y/o para reducir la autoinmunidad (Hogarth, 2002, *Current Opinion in Immunology*, 14: 798-802). En una realización, las variantes de Fc que proporcionan una unión mejorada al receptor inhibitorio FcγRIIb proporcionan una mejora de la estrategia terapéutica con IVIg. Dichas variantes de Fc actuarían por tanto como agonistas de FcγRIIb, y sería de esperar que potenciaran los efectos beneficiosos de la IVIg como agente terapéutico de enfermedad autoinmune, y también como modulador de la proliferación de células B. Adicionalmente, dichas variantes de Fc potenciadas con FcγRIIb también pueden ser modificadas adicionalmente para presentar la misma unión, o una unión limitada, a otros receptores. En realizaciones adicionales, las variantes de Fc con afinidad de FcγRIIb mejorada pueden combinarse con mutaciones que reducen o eliminan los otros receptores, potencialmente minimizando con ello aún más los efectos secundarios durante el uso terapéutico.

La unión o el bloqueo de receptores de Fc sobre células del sistema inmune pueden usarse para influir en la respuesta inmune en afecciones inmunológicas que incluyen, aunque sin limitación, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) y artritis reumatoide (RA) entre otras. Mediante el uso de las variantes de Fc de afinidad mejorada descritas en la presente memoria, se pueden reducir las dosis requeridas en las aplicaciones de IVIg típicas, pero obteniendo un efecto terapéutico sustancialmente similar. El potenciamiento de la unión a FcγRIIb aumentaría la actividad de expresión o de inhibición, según sea necesario, de dicho receptor y mejoraría la eficacia. Adicionalmente, la afinidad modulada de las variantes de Fc para activar FcγRs, FcRn y/o también complemento, también puede proporcionar beneficios.

Dichas aplicaciones inmunomoduladoras de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también pueden utilizarse en el tratamiento de indicaciones oncológicas, especialmente aquellas para las cuales la terapia implica mecanismos citotóxicos dependientes de anticuerpos. Por ejemplo, una variante de Fc que potencia la afinidad a FcγRIIb puede usarse para antagonizar dicho receptor inhibitorio, por ejemplo a través de la unión al sitio de unión Fc/FcγRIIb pero fallando en la activación, o reduciendo la señalización celular, incrementado potencialmente el efecto de la terapia anticáncer basada en anticuerpos. Dichas variantes de Fc, que actúan como antagonistas de FcγRIIb, pueden bloquear las propiedades inhibitorias de la FcγRIIb, o inducir su función inhibitoria como en el caso de la IVIg. Se puede usar un antagonista de FcγRIIb como co-terapia en combinación con cualquier otro agente terapéutico, que incluye, aunque sin limitación, anticuerpos, que actúan en base a la citotoxicidad relacionada con ADCC. Las variantes de Fc antagonísticas de FcγRIIb de este tipo pueden ser Fc o fragmentos de Fc aislados, aunque en realizaciones alternativas se pueden usar inmunoglobulinas.

“Enfermedades infecciosas” en la presente memoria incluye enfermedades producidas por patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas por virus que incluyen adenovirus, citomegalovirus, dengue, Epstein-Barr, hanta, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, herpes simple de tipo I, herpes simple de tipo II, virus de inmunodeficiencia humano (VIH), virus de papiloma humano (HPV), gripe, sarampión, paperas, virus del papova, polio, virus sincitial respiratorio, peste bovina, rinovirus, rotavirus, rubeola, virus del SARS, gripe aviar, meningitis vírica, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden ser producidas por bacterias que incluyen *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, difteria, *E. coli*, legionela, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium rickettsia*, *Mycoplasma nesissaria*, Pertussis, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumonia*, estreptococos, estafilococos, *Vibria cholerae*, *Yersinia pestis*, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden ser producidas por hongos tales como *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii*, y similares. Las enfermedades infecciosas también pueden estar producidas por protozoos y parásitos tales como chlamydia, kokzidioa, leishmania, malaria, rickettsia, tripanosoma, y similares.

Además, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar para prevenir o tratar afecciones adicionales que incluyen, aunque sin limitación, afecciones cardíacas tales como fallo cardíaco congestivo (CHF), miocarditis y otras afecciones del miocardio; afecciones cutáneas tales como rosácea, acné y eczema; afecciones óseas y dentales tales como pérdida ósea, osteoporosis, enfermedad de Paget, histiocitosis de célula de Langerhans, enfermedad periodontal, osteopenia de abandono, osteomalacia, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa poliostótica, metástasis ósea, gestión del dolor óseo, hipercalcemia maligna humoral, reconstrucción periodontal, lesión de médula espinal, y fracturas óseas; afecciones metabólicas tales como la enfermedad de Gaucher; afecciones endocrinas tales como el síndrome de Cushing; y afecciones neurológicas.

Un grupo de los receptores que pueden interactuar con las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria son polimórficos en la población humana. Para un paciente o población de pacientes dados, la eficacia de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden verse afectadas por la presencia o la ausencia de polimorfismos específicos en proteínas. Por ejemplo, el FcγRIIIa es polimórfico en la posición 158, que habitualmente es V (alta afinidad) o F (baja afinidad). Se ha observado que los pacientes con el genotipo homocigoto V/V presentan una mejor respuesta clínica al tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 Rituxan® (rituximab), probablemente debido a que estos pacientes montan una respuesta NK de mayor fortaleza (Dall'Ozzo et al. (2004) Cancer Res. 64: 4664-9). Otros polimorfismos adicionales incluyen, aunque sin limitación, FcγRIIa R131 o H131, y se sabe que dichos polimorfismos incrementan o reducen la unión a Fc y la consiguiente actividad biológica, dependiendo del polimorfismo, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se pueden unir preferencialmente a una forma polimórfica particular de un receptor, por ejemplo, FcγRIIIa 158 V, o unirse con afinidad equivalente a todos los polimorfismos en una posición particular del receptor, por ejemplo, ambos polimorfismos 158V y 158F de FcγRIIIa. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden presentar una unión equivalente a polimorfismos y se pueden usar en un anticuerpo para eliminar la eficacia diferencial observada en pacientes con diferentes polimorfismos. Esta propiedad puede dar lugar a una mayor consistencia en la respuesta terapéutica y reducir las poblaciones de pacientes que no responden. Dicha variante de Fc con unión idéntica a los polimorfismos de receptor puede presentar una actividad biológica incrementada, tal como ADCC, CDC o una vida media en circulación incrementada, o alternativamente una actividad reducida, vía modulación de la unión a los receptores de Fc relevantes. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden unirse con mayor o menor afinidad a uno de los polimorfismos de un receptor, acentuando la diferencia existente en la unión o revirtiendo dicha diferencia. Esta propiedad puede permitir la creación de agentes terapéuticos diseñados particularmente para aumentar la eficacia en una población de pacientes que posee dicho polimorfismo. Por ejemplo, una población de pacientes que posee un polimorfismo con una mayor afinidad por un receptor inhibitorio tal como FcγRIIb podría recibir un fármaco que contiene una variante de Fc con una unión reducida a dicha forma polimórfica del receptor, creando un fármaco más eficaz.

En una realización, los pacientes son sometidos a escrutinio en función de uno o más polimorfismos a fin de predecir la eficacia de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Esta información se puede usar, por ejemplo, para seleccionar pacientes para incluir o excluir de ensayos clínicos o, tras aprobación, para proporcionar una guía a los médicos y a los pacientes en relación a las dosis apropiadas y las opciones de tratamiento. Por ejemplo, en pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa 158F los fármacos de anticuerpo tales como el mAb anti-CD20, Rituximab son mínimamente efectivos (Carton 2002 Blood 99: 754-758; Weng 2003 J. Clin. Oncol. 21: 3940-3947); dichos pacientes pueden mostrar una respuesta clínica mucho mejor a los anticuerpos descritos en la presente memoria. En una realización, los pacientes son seleccionados para su inclusión en ensayos clínicos de una inmunoglobulina descrita en la presente memoria si su genotipo indica que es probable que respondan significativamente mejor a una inmunoglobulina descrita en la presente memoria que a una o más inmunoglobulinas terapéuticas usadas actualmente. En otra realización, se determinan las dosis y regímenes de tratamiento apropiados usando dicha información de genotipo. En otra realización, los pacientes son seleccionados para la inclusión en un ensayo clínico o para recibir una terapia post-aprobación en base a su genotipo de polimorfismo, donde dicha terapia contiene una inmunoglobulina diseñada para ser eficaz específicamente en dicha población, o alternativamente donde dicha terapia contiene una variante de Fc que no muestra una actividad diferencial con las diferentes formas del polimorfismo.

También se describen tests diagnósticos para identificar pacientes que tienen probabilidad de mostrar una respuesta clínica favorable a una inmunoglobulina asociada en la presente memoria, o que tienen probabilidad de exhibir una respuesta significativamente mejor cuando son tratados con una inmunoglobulina descrita en la presente memoria en comparación con una o más inmunoglobulinas terapéuticas usadas actualmente. Se puede usar cualquiera de una serie de métodos para determinar los polimorfismos de FcγR en humanos conocidos en la técnica.

Adicionalmente, también se describen tests pronósticos llevados a cabo con muestras clínicas tales como muestras sanguíneas o de tejido. Dichos tests puede evaluar la actividad de la función efectora, que incluye, aunque sin limitación, ADCC, CDC, fagocitosis y opsonización, o para matar, independientemente del mecanismo, células cancerosas o patógenas. En una realización, se usan ensayos de ADCC, tal como los descritos previamente, para predecir, para un paciente específico, la eficacia de una inmunoglobulina dada descrita en la presente memoria. Dicha información puede usarse para identificar pacientes para su inclusión o su exclusión en ensayos clínicos, o para informar de decisiones relativas a las dosis y regímenes de tratamiento apropiados. Dicha información también se puede usar para seleccionar un fármaco que contiene una inmunoglobulina particular que muestra una actividad superior en dicho ensayo.

#### Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formula una inmunoglobulina descrita en la presente memoria y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se preparan para almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que presenta el grado deseado de pureza, opcionalmente con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o de disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en

las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen disoluciones tamponadas tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butil orbencilo; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y tricresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; rellenos tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglomerantes; aditivos; agentes colorantes; contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilen glicol (PEG). En una realización, la composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede adoptar una forma soluble en agua, tal como estar presente en sales farmacéuticamente aceptables, que se pretende que incluya tanto sales de adición ácido como básica. "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son indeseadas biológicamente o de cualquier otra forma, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico, y similares. "Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" incluye aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares. Algunas realizaciones incluyen al menos una de las sales de amonio, potasio, sodio, cálcico y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones que van a usarse para administración in vivo pueden ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril o mediante otros métodos.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria también se pueden formular como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que son útiles para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77: 4030; y las patentes US 4.485.045; US 4.544.545 y PCT WO 97/38731. En la patente US 5.013.556 se describen liposomas con un tiempo de circulación aumentado. Los componentes de los liposomas normalmente se disponen en una formación bicapa, similar a la disposición de lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Opcionalmente dentro del liposoma está contenido un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo (Gabizon et al., 1989, J National Cancer Inst 81: 1484).

La inmunoglobulina y otros agentes terapéuticamente activos también se pueden presentar confinados en microcápsulas preparadas mediante métodos que incluyen, aunque sin limitación, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli-(metilmetacrilato)), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), y macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed., 1980. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímero hidrofóbico sólido, matrices que se encuentran en forma de artículos conformados, p.ej. películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico, y ProLease® (disponible comercialmente en Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicolida (PLG).

#### Administración

La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina descrita en la presente memoria, p.ej., en la forma de una disolución acuosa estéril, puede realizarse en una variedad de formas, que incluyen, aunque sin limitación, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraoticalmente, transdérmicamente, tópicamente (p.ej., geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, parenteralmente, rectalmente o intraocularmente. En

algunos casos, por ejemplo para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la inmunoglobulina se puede aplicar directamente como una disolución o spray. Como es sabido en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse de acuerdo al modo de introducción.

5 La administración subcutánea se puede usar en circunstancias en las que el paciente puede auto-administrarse la composición farmacéutica. Muchos agentes terapéuticos proteínicos no son suficientemente potentes para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente efectiva en el volumen máximo aceptable para administración subcutánea. Este problema se puede abordar en parte mediante el uso de formulaciones proteínicas que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato (ver el documento WO 04091658). Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser más adecuados para administración subcutánea debido, por ejemplo, a su potencia  
10 mejorada, su vida media en suero mejorada o su solubilidad mejorada.

Como es sabido en la técnica, los agentes terapéuticos proteínicos a menudo se administran mediante infusión IV o de bolo. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden administrarse usando tales métodos. Por ejemplo, la administración puede ser mediante infusión intravenosa con cloruro sódico al 0,9% como vehículo de infusión.

15 La administración pulmonar se puede lograr usando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de aerosol. Por ejemplo, se puede usar la tecnología inhalable AERx® disponible comercialmente en Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance(TM) disponible comercialmente en Nektar Therapeutics. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser más adecuados para la administración intrapulmonar. El FcRn está presente en el pulmón, y puede promocionar el transporte desde el pulmón hasta el torrente sanguíneo (p.ej., Syntonix, patente WO 04004798, Bitonti et al. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101: 9763-8). Por consiguiente, los anticuerpos que se unen a FcRn más efectivamente en el pulmón o que son liberados más eficientemente en el torrente sanguíneo pueden presentar una biodisponibilidad mejorada tras una administración intrapulmonar. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ser más adecuados para administración intrapulmonar debido, por ejemplo, a una mejor solubilidad o un punto isoeléctrico alterado.

25 Adicionalmente, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria pueden ser adecuadas para administración oral debido, por ejemplo, a una estabilidad mejorada a pH gástrico y una resistencia incrementada frente a la proteólisis. Adicionalmente, el FcRn parece expresarse en los epitelios intestinales de adultos (Dickinson et al. (1999) J. Clin. Invest. 104: 903-11), por lo que los anticuerpos descritos en la presente memoria con perfiles de interacción con FcRn mejorados pueden mostrar una biodisponibilidad mejorada después de una administración oral. El transporte mediado por FcRn de anticuerpos también se puede producir en otras membranas mucosas tales como las de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genital (Yoshida et al. (2004) Immunity 20: 769-83).

Adicionalmente, se puede usar cualquiera de una serie de sistemas de administración conocidos en la técnica para administrar los anticuerpos descritos en la presente memoria. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (p.ej., microesferas de PLA/PGA), y similares.  
35 Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o matriz tal como poliésteres, hidrogeles, poli(vinil alcohol), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilenoacetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot®, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina descrita en la presente memoria, por ejemplo mediante infección retroviral, inyección directa o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular, u otros agentes de transfección. En todos los casos, se pueden usar sistemas de liberación controlada para liberar la inmunoglobulina en la locación deseada de acción, o en sus proximidades.

#### Dosificación

45 Las cantidades y las frecuencias de las dosis de administración se seleccionan, en una realización, para ser efectivas terapéuticamente o profilácticamente. Como es sabido en la técnica, pueden ser necesarios ajustes por la degradación de la proteína, para la administración sistémica frente a localizada, y por la tasa de nueva síntesis de proteasa, así como por la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y se podrá determinar mediante experimentación rutinaria por parte de los especialistas en la técnica.

50 La concentración de la inmunoglobulina terapéuticamente activa en la formulación puede variar desde aproximadamente 0,1 a 100 % en peso. En una realización, la concentración de la inmunoglobulina está en el rango de 0,003 a 1,0 molar. A fin de tratar a un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva de la inmunoglobulina descrita en la presente memoria. Con "dosis terapéuticamente efectiva" en la presente memoria se pretende indicar una dosis que produce los efectos para los cuales es administrada. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y el especialista en la técnica podrá determinarla usando técnicas conocidas. Las dosis pueden oscilar entre 0,0001 y 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal. En una realización, las dosis oscilan entre 1 y 10 mg/kg.

En algunas realizaciones, solo se usa una dosis individual de la inmunoglobulina. En otras realizaciones, se administran dosis múltiples de la inmunoglobulina. El tiempo transcurrido entre administraciones debe ser inferior a 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, o más de dos semanas.

En otras realizaciones los anticuerpos descritos en la presente memoria se administran en regímenes de dosis metronómicos, tanto por infusión continua como por administración frecuente sin periodos de descanso extendidos. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación a intervalos constantes sin periodos de descanso. Típicamente, dichos regímenes abarcan dosis crónicas bajas o infusión continua durante un periodo de tiempo extendido, por ejemplo 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses o hasta 6 meses o más. El uso de dosis menores puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de periodos de descanso.

En determinadas realizaciones la inmunoglobulina descrita en la presente memoria y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales son administrados cíclicamente al paciente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente en una primera vez, de un segundo agente en una segunda vez, opcionalmente agentes adicionales en tiempos adicionales, opcionalmente un periodo de descanso, y a continuación se repite esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos típicamente es de 2 – 10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar efectos secundarios o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

#### Terapias de combinación

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser administrados concomitantemente con uno o más regímenes o agentes terapéuticos adicionales. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o la seguridad de la inmunoglobulina. Asimismo, se pueden usar los regímenes o agentes terapéuticos adicionales para tratar la misma enfermedad o una co-morbidez más que para alterar la acción de la inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede administrar una inmunoglobulina descrita en la presente memoria al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o tanto quimioterapia como terapia de radiación. La inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede administrarse en combinación con uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, que incluyen, aunque sin limitación, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores de crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de angiogénesis, inhibidores de proteína tirosina quinasa (PTK), anticuerpos adicionales, FcγRIIb u otros receptores de Fc, u otros agentes terapéuticos.

Los términos “en combinación con” y “co-administración” no están limitados a la administración de dichos agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En su lugar, se pretende que la inmunoglobulina descrita en la presente memoria y el otro agente o agentes sea(n) administrado(s) en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que puedan actuar juntos para proporcionar un beneficio que aumenta con respecto al tratamiento con la inmunoglobulina descrita en la presente memoria sola o el agente o agentes adicional(es) solo(s). En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria y el otro agente o agentes actúan aditivamente, y algunas veces sinérgicamente. Dichas moléculas se presentan de forma adecuada en combinación con cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. El médico con experiencia puede determinar empíricamente, o considerando la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis apropiadas de cada agente terapéutico, así como los tiempos y métodos apropiados para la administración.

En una realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria se administran con una o más moléculas adicionales que comprenden anticuerpos o Fc. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden co-administrarse con uno o más anticuerpos adicionales que presenten eficacia en el tratamiento de la misma enfermedad o de una co-morbidez adicional; por ejemplo se pueden administrar dos anticuerpos que reconozcan dos antígenos que estén sobre-expresados en un tipo dado de cáncer, o dos antígenos que medien en la patogénesis de una enfermedad autoinmune o infecciosa.

Los ejemplos de anticuerpos anti-cáncer que pueden co-administrarse incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos de antígeno de superficie celular anti-17-1A tales como Panorex™ (edrecolomab); anticuerpos anti-4-1 BB; anticuerpos anti-4Dc; anticuerpos anti-A33 tales como A33 y CDP-833; anticuerpos de integrina anti-[sigma]4β7 tales como LDP-02; anticuerpos de integrina anti-[sigma]4V/?1 tales como F-200, M-200 y SJ-749; anticuerpos de integrina anti-[sigma]Vβ3 tales como abciximab, CNTO-95, Mab-17E6, y Vitaxin™; anticuerpos anti-complemento factor 5 (C5) tales como 5G1.1; anticuerpos anti-CA125 tales como OvaRex® (oregovomab); anti-CD3 anticuerpos tales como Nuvion® (visilizumab) y Rexomab; anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; anticuerpos anti-CD6 tales como Oncolysin B y Oncolysin CD6; anti-CD7 anticuerpos tales como HB2; anti-CD19 anticuerpos tales como B43, MT-103 y Oncolysin B; anticuerpos anti-CD20 tales como 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.V115, Bexxar® (tositumomab, anti-CD20 marcado con I-131), Rituxan® (rituximab) y Zevalin® (Ibritumomab tiuxetano, anti-CD20 marcado con Y-90); anticuerpos anti-CD22 tales como Lymphocide™ (epratuzumab, anti-CD22 marcado con Y-90); anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC-152; anticuerpos anti- CD25 tales como basiliximab y

Zenapax® (daclizumab); anticuerpos anti-CD30 tales como AC10, MDX-060 y SGN-30; anticuerpos anti-CD33 tales como Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicina), Oncolysin M y Smart M195; anticuerpos anti-CD38; anticuerpos anti-CD40 tales como SGN-40 y toralizumab; anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova™ e IDEC-131; anticuerpos anti-CD44 tales como bivatuzumab; anticuerpos anti-CD46; anticuerpos anti-CD52 tales como Campath® (alemtuzumab); anticuerpos anti-CD55 tales como SC-1; anticuerpos anti-CD56 tales como huN901-DM1; anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33; anticuerpos anti-CD66e tales como XR-303; anticuerpos anti-CD74 tales como IMMU-110; anticuerpos anti-CD80 tales como galiximab e IDEC-114; anticuerpos anti-CD89 tales como MDX-214; anticuerpos anti-CD123; anticuerpos anti-CD138 tales como B-B4-DM1; anticuerpos anti-CD146 tales como AA-98; anticuerpos anti-CD148; anticuerpos anti-CEA tales como CT84.66, labetuzumab y Pentacea™; anticuerpos anti-CTLA-4 tales como MDX-101; anticuerpos anti-CXCR4; anticuerpos anti-EGFR tales como ABX-EGF, Erbitux® (cetuximab), IMC-C225 y Merck Mab 425; anticuerpos anti-EpCAM tales como anti-EpCAM de Crucell, ING-1 y IS-IL-2; anticuerpos anti-efrina B2/EphB4; anticuerpos anti-Her2 tales como Herceptin®, MDX-210; anticuerpos anti-FAP (proteína de activación de fibroblasto) tales como sibrotuzumab; anticuerpos anti-ferritina tales como NXT-211; anticuerpos anti-FGF-1; anticuerpos anti-FGF-3; anticuerpos anti-FGF-8; anticuerpos anti-FGFR, anticuerpos anti-fibrina; anticuerpos anti-G250 tales como WX-G250 y Rencarex®; anticuerpos anti-GD2 de gangliosido tales como EMD-273063 y TriGem; anticuerpos anti-GD3 de gangliosido tales como BEC2, KW-2871 y mitumomab; anticuerpos anti-gp11b/IIIa tales como ReoPro; anticuerpos anti-heparinasa; anticuerpos anti-Her2/ErbB2 tales como Herceptin® (trastuzumab), MDX-210 y pertuzumab; anticuerpos anti-HLA tales como Oncolym®, Smart 1 D10; anticuerpos anti-HM1.24; anticuerpos anti-ICAM tales como ICM3; anticuerpos anti-IgA de receptor; anticuerpos anti-IGF-1 tales como CP-751871 y EM-164; anticuerpos anti-IGF-1 R tales como IMC-A12; anticuerpos anti-IL-6 tales como CNTO-328 y elsilimomab; anticuerpos anti-IL-15 tales como HuMax™-IL15; anticuerpos anti-KDR; anticuerpos anti-laminina 5; anticuerpos anti-antígeno Y de Lewis tales como Hu3S193 y IGN-311; anticuerpos anti-MCAM; anticuerpos anti-Mud tales como BravaRex y ThAb; anticuerpos anti-NCAM tales como ERIC-1 y ICRT; anticuerpos anti-antígeno PEM tales como Theragyn y Therex; anticuerpos anti-PSA; anticuerpos anti-PSCA tales como IG8; anticuerpos anti-Ptk; anticuerpos anti-PTN; anticuerpos anti-RANKL tales como AMG-162; anticuerpos anti-RLIP76; anticuerpos anti-antígeno SK-1 tales como Monopharm C; anticuerpos anti-STEAP; anticuerpos anti-TAG72 tales como CC49-SCA y MDX-220; anticuerpos anti-TGF-β tales como CAT-152; anticuerpos anti-TNF-α tales como CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab); anticuerpos anti-TRAIL-R1 y TRAIL-R2; anticuerpos anti-VE-caderina-2 y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren™. Adicionalmente, se puede usar cualquier anticuerpo anti-idiotipo que incluye, aunque sin limitación el anticuerpo de epítipo GD3 BEC2 y el anticuerpo de epítipo gp72 105AD7. Adicionalmente, se pueden usar anticuerpos bi-específicos que incluyen, aunque sin limitación, el anticuerpo anti-CD3/CD20 Bi20.

Los ejemplos de anticuerpos que pueden co-administrarse para tratar enfermedades autoinmunes o inflamatorias, rechazo de trasplante, GVHD, y similares, incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos anti-α4β7 integrina tales como LDP-02, anticuerpos anti-beta2 integrina tales como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) tales como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 tales como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3, anti-CD3 SMART, anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD14 tales como IC14, anticuerpos anti-CD18, anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 tales como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 tales como IDEC-114, anticuerpos anti-CD147 tales como ABX-CBL, anticuerpos anti-E-selectina tales como CDP850, anticuerpos anti-gp11b/IIIa tales como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 tales como ICM3, anticuerpos anti-ICE tales como VX-740, anticuerpos anti-FcγR1 tales como MDX-33, anticuerpos anti-IgE tales como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 tales como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 tales como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 tales como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma y anticuerpos anti-TNFα tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren. Los ejemplos de otras moléculas que contienen Fc que pueden ser co-administradas para tratar enfermedades autoinmunes o inflamatorias, rechazo de trasplante, GVHD, y similares, incluyen, aunque sin limitación, la fusión receptor p75 de TNF/Fc Enbrel® (etanercept) y la trampa de IL-1 de Regeneron.

Los ejemplos de anticuerpos que pueden co-administrarse para tratar enfermedades infecciosas incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos anti-ántrax tales como ABthrax, anticuerpos anti-CMV tales como CytoGam y sevirumab, anticuerpos anti-cryptosporidium tales como CryptoGAM, Sporidin-G, anticuerpos anti-helicobacter tales como Pyloran, anticuerpos anti-hepatitis B tales como HRG-214, anticuerpos anti-RSV tales como felvizumab, HNK-20, palivizumab, RespiGam y anticuerpos anti-estafilococos tales como Aurexis, Aurograb, BSYX-A110 y SE-Mab.

Alternativamente, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden co-administrar con una o más moléculas adicionales que compitan por la unión a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, la co-administración de inhibidores del receptor inhibidor FcγRIIb puede dar como resultado un incremento de la función efectora. De forma similar, la coadministración de inhibidores de receptores activantes tales como el FcγRIIIa puede minimizar una función efectora no deseada. Los inhibidores de receptor de Fc incluyen, aunque sin limitación, moléculas de Fc que han sido diseñadas para actuar como inhibidores competitivos por la unión a FcγRIIb, FcγRIIIa u otros receptores de Fc, así como otras inmunoglobulinas y específicamente el tratamiento denominado IVIg (inmunoglobulina intravenosa). En una realización, el inhibidor se administra y se deja actuar antes de que se administre la inmunoglobulina. Un modo alternativo de lograr el efecto de una dosis secuencial sería proporcionar una forma de dosis de liberación inmediata del inhibidor de receptor de Fc y a continuación una formulación de liberación

sostenida de una inmunoglobulina descrita en la presente memoria. Las formulaciones de liberación inmediata y de liberación controlada podrían administrarse por separado o podrían combinarse en una forma de dosis unitaria. La administración de un inhibidor de FcγRIIb también se puede usar para limitar respuestas inmunes no deseadas, por ejemplo la respuesta de anticuerpos anti-Factor VIII tras una administración de Factor VIII en hemofílicos.

5 En una realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria se administran con un agente quimioterapéutico. Con "agente quimioterapéutico" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, 10 epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, 15 olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti estrógenos que incluyen por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LI 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y 20 uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen alretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; rellenos de ácido fólico tales como ácido frolínico; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, oxihidrocloruro de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos 25 de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; proteínas de platino tales como arginina desiminasa y asparaginasa; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didaoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, p.ej. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Miers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antoni, Francia); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; inhibidor de 30 timidilato sintasa (tal como Tomudex); agentes quimioterapéuticos adicionales que incluyen aceglatona; aldofosfamida glicosido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK(R); razoxano; sizofurano; espirogermanio; ácido 35 tenuazonico; triaziquna; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etoposide (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposide; daunomicina; aminopterina; xelode; ibironato; CPT-11; ácido 40 retinoico; esperamicinas; capecitabina. También se pueden usar sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un agente quimioterapéutico u otro agente citotóxico puede ser administrado como profármaco. Con "profármaco" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos tóxica para células tumorales que el fármaco original de partida, y que es 45 capaz de ser activado o convertido enzimáticamente en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14: 375-382; Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery; y Borhardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Los profármacos que pueden ser útiles con las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que 50 contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con ácido D-amino, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden ser convertidos en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden ser derivatizados en una forma de profármaco para uso con los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de los agentes quimioterapéuticos mencionados anteriormente.

55 Una variedad de otros agentes terapéuticos pueden encontrar utilidad para administración con los anticuerpos descritos en la presente memoria. En una realización, la inmunoglobulina se administra con un agente anti-angiogénico. Con "agente anti-angiogénico" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un compuesto que bloquea, o interfiere en cierta medida, en el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión de Fc 60 o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o a un receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de la angiogénesis. En una realización, un factor anti-angiogénico puede ser un anticuerpo que se une a Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF). También se pueden usar otros agentes que inhiben la señalización a través de VEGF, por ejemplo agentes terapéuticos basados en ARN que reducen los niveles de

VEGF o la expresión de VEGF-R, fusiones VEGF-toxina, trampa de VEGF de Regeneron, y anticuerpos que se unen a VEGF-R. En una realización alternativa, el anticuerpo se administra con un agente terapéutico que induce o potencia una respuesta inmune adaptativa, por ejemplo un anticuerpo dirigido a CTLA-4. Otros agentes anti-angiogénesis adicionales incluyen, aunque sin limitación, angioestatina (fragmento de plasminógeno), anti-trombina III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, benefina, bevacizumab, bisfosfonatos, BMS-275291, inhibidor derivado de cartilago (CDI), CAI, fragmento de complemento CD59, CEP-7055, Col 3, combretastatina A-4, endostatina (fragmento XVIII de colágeno), inhibidores de farnesil transferasa, fragmento de fibronectina, gro-beta, halofuginona, heparinasas, fragmento de hexasacárido de heparina, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, proteína inducible de interferón 10 (IP-10), interleuquina 12, kringle 5 (fragmento de plasminógeno), marimastat, inhibidores de metaloproteínasa (p.ej., TIMPs), 2-metodiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), inhibidor de activador de plasminógeno (PAI), factor-4 de plaqueta (PF4), prinomastat, fragmento de prolactina de 16 kDa, proteína relacionada con proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastat, escualamina, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, tetrahidrocortisol-S, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1), TNP-470, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), vasculostatina, vasostatina (fragmento de calreticulina), ZS6126 y ZD6474.

En una realización, la inmunoglobulina se administra con un inhibidor de tirosina quinasa. Con "inhibidor de tirosina quinasa" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar una molécula que inhibe en cierta medida la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, aunque sin limitación, quinazolinas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo(2,3-d) pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirsosftinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (p.ej., aquellas que se unen a ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (patente US 5.804.396); trifostinas (US 5.804.396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); inhibidores pan-ErbB tales como C1-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesilato (STI571, Gleevec®; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); C1- 1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (Astra-Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1 C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: US 5.804.396; PCT WO 99/09016 (American Cyanimid); PCT WO 98/43960 (American Cyanamid); PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT WO96/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA™, ZD1839, AstraZeneca) y OSI-774 (Tarceva™), OSI Pharmaceuticals/Genentech).

En otra realización, la inmunoglobulina se administra con uno o más agentes inmunomoduladores. Dichos agentes pueden aumentar o reducir la producción de una o más citoquinas, regular al alza o a la baja la presentación de auto-antígenos, enmascarar antígenos de MHC, o promover la proliferación, diferenciación, migración o estado de activación de uno o más tipos de células inmunes. Los agentes inmunomoduladores incluyen, aunque sin limitación: fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) tales como aspirina, ibuprofed, celecoxib, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, indometacina, ketoralac, oxaprozina, nabumentona, sulindac, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, ketoprofeno y nabumetona; esteroides (p.ej. glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, trimcinolona, azulfidíneicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos; así como esteroides tópicos tales como antralina, calcipotrieno, clobetasol y tazaroteno); citoquinas tales como TGF $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10; antagonistas de citoquina, quimioquina o receptor, que incluyen anticuerpos, receptores solubles y fusiones receptor-Fc contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, factores de complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN[ $\sigma$ ], IFN/S, IFNK, IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL- 4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9 IL-12, IL-13, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, selectinas, TGF/? , TNF[ $\sigma$ ], TNF?, TNF[ $\sigma$ ], TNF-R1, receptor de célula T, que incluye Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab); globulina anti-linfocito heteróloga; otras moléculas inmunomoduladoras tales como pirimidinas sustituidas en 2-amino-6-aryl-5, anticuerpos anti-idiotípicos para péptidos de unión a MHC y fragmentos de MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-penicilamina, desoxiespergualina, FK506, glutaraldehido, oro, hidroxicloquina, leflunomida, malononitriloamidas (p.ej. leflunomida), metotrexato, minociclina, mizorribina, micofenolato mofetil, rapamicina y sulfasasazina.

En una realización alternativa, las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria se administran con una citoquina. Con "citoquina" tal como se usa en la presente memoria se pretende indicar un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citoquinas son las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas de polipéptido tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están las hormonas de crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, la N-metionil hormona de crecimiento humana, y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la pro-relaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante de foliculo (FSH), la hormona estimulante de tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblasto; la prolactina; el lactógeno de placenta; el factor de necrosis tumoral alfa y beta; la sustancia inhibidora muleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales

como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGFs) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonia (CSFs) tales como CSF de macrófago (M-CSF); CSF de granulocito-macrófago (GM-CSF) y CSF de granulocito (G-CSF); interleuquinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL- 11, IL-12, IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores de polipéptido que incluyen LIF y kit ligando (KL). Tal como se usa en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

En una realización, las citoquinas u otros agentes que estimulan células del sistema inmune son co-administradas con la inmunoglobulina descrita en la presente memoria. Este modo de tratamiento puede potenciar la función efectora deseada. Por ejemplo, se pueden co-administrar agentes que estimulan células NK, que incluyen, aunque sin limitación IL-2. En otra realización, se pueden co-administrar agentes que estimulan macrófagos, que incluyen, aunque sin limitación, C5a, péptidos de formilo tales como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre et al. (2003) Scand. J. Immunol. 57: 221-8). Del mismo modo, se pueden administrar agentes que estimulan neutrófilos, que incluyen, aunque sin limitación, G-CSF, GM-CSF y similares. Además, también se pueden usar agentes que promueven la migración de dichas citoquinas inmunoestimuladoras. También promover una o más funciones efectoras otros agentes adicionales que incluyen, aunque sin limitación, interferón gamma, IL-3 e IL-7.

En una realización alternativa, se co-administran citoquinas u otros agentes que inhiben la función celular efectora con la inmunoglobulina descrita en la presente memoria. Dicho modo de tratamiento puede limitar una función efectora no deseada.

En una realización adicional, la inmunoglobulina se administra con uno o más antibióticos, que incluyen, aunque sin limitación: antibióticos de minoglicosido (p.ej., apramicina, arbecacina, bambermicinas, butirosina, dibecacina, gentamicina, canamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectrinomicina), aminociclitoles (p.ej., esprotrinomicina), antibióticos de amfenicol (p.ej., azidamfenicol, cloramfenicol, florfanicol, y tiamfemicol), antibióticos de ansamicina (p.ej., rifamida y rifampina), carbapenemos (p.ej., imipenem, meropenem, panipenem); cefalosporinas (p.ej., cefaclor, cefadroxil, cefamiol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefuroxina, cefixima, cefalexina, cefradina), cefamicinas (cefbuperazona, cefoxitina, cefminox, cefmetazol y cefotetam); lincosamidas (p.ej., clindamicina, lincomicina); macrolida (p.ej., azitromicina, brefeldina A, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, tobramicina), monobactamas (p.ej., aztreonam, carumonam, y tigemonam); mupirocina; oxacefemos (p.ej., flomoxef, latamoxef, y moxalactam); penicilinas (p.ej., amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamecilina, hidroyoduro de penetamato, penicilina obenetamina, penicilina O, penicilina V, benzoato de penicilina V, hidrabamina de penicilina V, penimepicipilina y fencihicilina de potasio); polipéptidos (p.ej., bacitracina, colistina, polimixina B, teicoplanina, vancomicina); quinolonas (amifloxacina, cinaoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacina, feroxacina, flumequina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, pefloxacina, ácido pipemídico, rosoxacina, rufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, trovafloxacina); rifampina; estreptograminas (p.ej., quinupristina, dalfopristina); sulfonamidas (sulfanilamida, sulfametoxazol); tetraciclenos (clortetraciclina, hidroclozuro de demeclociclina, dimetilclortetraciclina, doxiciclina, duramicina, minociclina, neomicina, oxitetraciclina, estreptomina, tetraciclina, vancomicina).

También se pueden usar agentes anti-fúngicos tales como anfotericina B, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, itraconazol, cetoconazol, niconazol, nistatina, terbinafina, terconazol y tioconazol.

También se pueden usar agentes antivíricos que incluyen inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa, y otros, incluyendo interferones de tipo I, inhibidores de fusión vírica e inhibidores de neuramidasa. Los ejemplos de agentes antivíricos que se pueden usar incluyen, aunque sin limitación, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, clevadina, enfuvirtida, entecavir, foscarnet, gangciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, trifluridina, vidarabina y zidovudina.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden combinarse con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, en una realización, el paciente que va a ser tratado con una inmunoglobulina descrita en la presente memoria también puede recibir terapia de radiación. La terapia de radiación puede administrarse según los protocolos empleados habitualmente en la técnica y habituales para los especialistas en la misma. Dicha terapia incluye, aunque sin limitación, radiación de cesio, iridio, yodo o cobalto. La terapia de radiación puede ser irradiación del cuerpo entero o puede estar dirigida localmente a un sitio o tejido específico del interior o del exterior del cuerpo, tal como el pulmón, la vejiga o la próstata. Típicamente, la terapia de radiación se administra en pulsos a lo largo de un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 y 2 semanas. Sin embargo, la terapia de radiación puede administrarse a lo largo de periodos de tiempo más largos. Por ejemplo, la terapia de radiación se puede administrar a pacientes que tengan cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente 6 a aproximadamente 7 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación se puede administrar como una dosis individual o como múltiples dosis secuenciales. El médico especialista puede determinar empíricamente la dosis o dosis apropiadas de terapia de radiación útiles en el presente contexto. De acuerdo a otra realización, una inmunoglobulina descrita en la presente memoria y una o más terapias anti-cáncer adicionales se emplean para tratar células cancerosas ex vivo. Se

contempla que dicho tratamiento ex vivo pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y particularmente en el trasplante de médula ósea autóloga. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejido(s) que contienen células cancerosas con inmunoglobulina y una o más terapias anti-cáncer adicionales, tal como las descritas anteriormente, se puede emplear para agotar o agotar sustancialmente las células cancerosas antes del trasplante en un paciente receptor.

Por supuesto, se contempla que los anticuerpos descritos en la presente memoria puedan emplearse en combinación con otras técnicas terapéuticas adicionales tales como cirugía o fototerapia.

### Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos con fines meramente ilustrativos. Dichos ejemplos no pretenden limitar ninguna realización descrita en la presente memoria para ninguna aplicación particular o teoría de operación particular.

#### Ejemplo 1. Nuevos métodos para inhibir células FcγRIIb<sup>+</sup>

El FcγRIIb se expresa en una variedad de células inmunes, que incluyen células B, células plasmáticas, células dendríticas, monocitos y macrófagos, donde desempeña un papel crítico en la regulación inmune. En su función normal en las células B, el FcγRIIb actúa como mecanismo de retroalimentación para modular la activación de células B a través del receptor de células B (BCR). El enfrentamiento de receptor de antígeno de célula B (BCR) con el antígeno inmune acoplejado sobre células B maduras activa una cascada de señalización intracelular, que incluye la movilización de calcio, lo que conduce a la proliferación y diferenciación de células. Sin embargo, como se producen anticuerpos de IgG con especificidad por el antígeno, los complejos inmunes asociados (ICs) puede hacer interaccionar el BCR con el FcγRIIb, mediante lo cual la activación de BCR es inhibida por el enfrentamiento a FcγRIIb y los mecanismos de señalización intracelular asociados que interfieren con las rutas posteriores de la activación de BCR.

Las células B no solo funcionan para producir anticuerpo y citoquinas que controlan la respuesta inmune, también son células presentadoras de antígeno (APCs). La internalización del antígeno por parte del BCR en una célula B puede desempeñar un papel en la presentación y la activación de células T. La regulación de la activación de células B a través de BCR también está regulada potencialmente por el enfrentamiento de anticuerpo de FcγRIIb. Otras APCs como las células dendríticas, los macrófagos y los monocitos, son capaces de internalizar antígeno ligado a anticuerpo a través de receptores activantes tales como FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRI. La expresión de FcγRIIb sobre estos tipos de células, particularmente las células dendríticas, puede inhibir la activación de estos tipos de células y la posterior presentación y activación de células T (Desai et al., 2007, J Immunol).

Una nueva estrategia para inhibir la activación de los tipos de células mencionados anteriormente es usar una única inmunoglobulina para coenfrentar FcγRIIb con el antígeno superficial presente sobre la célula FcγRIIb<sup>+</sup>. En el caso de células B, en base al mecanismo biológico natural, esto podría implicar potencialmente un ataque dual de FcγRIIb y BCR, con la meta de imitar la supresión mediada por complejo inmune de la activación de células B. La Figura 3 ilustra dicho mecanismo potencial, en el que se usa un anticuerpo para coenfrentar tanto FcγRIIb a través de su región de Fc, como un antígeno diana asociado al complejo BCR, en este ejemplo CD19, a través de su región de Fv.

#### Ejemplo 2. Diseño de inmunoglobulinas con afinidad selectivamente potenciada por FcγRIIb

En condiciones fisiológicas, la unión de BCR con FcγRIIb y la posterior supresión de células B se produce a través de complejos inmunes de IgGs y antígeno cognado. La estrategia de diseño fue reproducir este efecto usando un único anticuerpo reticulante. La IgG humana se une a FcγRIIb humana con una afinidad débil (aproximadamente 1 μM para IgG1), y la inhibición mediada por FcγRIIb se produce como respuesta a IgG formando complejo inmune pero no a IgG monomérica. Se razonó que el aumento de la afinidad de Fc por este receptor sería necesaria para una inhibición máxima de la activación de células B. Se usaron métodos de ingeniería de proteínas para diseñar y escrutar variantes de Fc en busca de una unión a FcγRIIb potenciada.

Además de esta primera meta de diseño (máxima afinidad de Fc a FcγRIIb), una meta de diseño secundaria fue reducir la interacción de la región de Fc con FcγRs activantes. Los perfiles de afinidad de FcγR que pueden ser óptimos para inhibir células FcγRIIb incluyen no solo una elevada afinidad por el receptor inhibitor FcγRIIb, sino también potencialmente una elevada afinidad de FcγRIIb acoplada a una afinidad reducida a uno o más receptores activantes, que incluyen, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIIa y/o FcγRIIa. Una afinidad reducida a los receptores activantes puede conducir a una toxicidad reducida asociada a un tratamiento con anticuerpos. Por ejemplo, una afinidad reducida a FcγRIIIa, presente en células NK, debería reducir el nivel de ADCC mediada por células NK. De forma similar, una afinidad reducida a FcγRIIa, presente en una variedad de células efectoras que incluyen macrófagos y neutrófilos, debería reducir el nivel de fagocitosis (ADCP) mediada por estas células. Adicionalmente, para monocitos, macrófagos, células dendríticas, y similares, una interacción reducida con FcγRs activantes significaría que la inmunoglobulina estaría más libre para interaccionar con el FcγRIIb de la superficie celular.

Usando estructuras resueltas del complejo Fc/FcγRIIb humano (y las secuencias de los FcγRs humanos), se usaron análisis estructural y de secuencia para identificar posiciones de FcγR que contribuyen a la afinidad y la selectividad de FcγRIIb respecto a los receptores activantes. La estrategia de diseño empleó dos etapas. En primer lugar, se identificaron las posiciones de FcγR que son determinantes de la selectividad de unión de FcγRIIb y FcγRIIIa teniendo en cuenta la proximidad a la interfaz FcγR/Fc y la disimilitud de aminoácidos entre FcγRIIb y FcγRIIIa. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 4. En segundo lugar, se identificaron las posiciones de secuencia de la región de Fc próximas a dichas posiciones de FcγR. Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 5. Se diseñaron variantes de Fc que incorporan sustituciones de estas posiciones.

Se generó una biblioteca de variantes de Fc y se realizó un escrutinio para explorar modificaciones de aminoácido en dichas posiciones. Se generaron variantes y se escrutinaron en el contexto de un anticuerpo dirigido al antígeno CD19, un componente regulador del complejo de co-receptor BCR. La región de Fv de este anticuerpo es una versión humanizada y madurada en afinidad del anticuerpo 4G7, y es referida en la presente memoria como HuAM4G7. Las secuencias de aminoácido de este anticuerpo se proporcionan en la Figura 54. Los genes de Fv para este anticuerpo fueron subclonados en el vector de expresión de mamífero pTT5 (National Research Council, Canadá). Las mutaciones en el dominio de Fc fueron introducidas usando mutagénesis sito-dirigida (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, TX). Adicionalmente, se generaron variantes bloqueadas con afinidad eliminada por receptores de Fc que comprendían la sustitución L328R, y una sustitución G236R o una Arg insertada después de la posición 236. Estas variantes (G236R/L328R y <[Lambda]>236R/L328R) son referidas como Fc-KO o FcγR bloqueado. Para actuar como controles de isotipo de Fc no CD19, se construyeron anticuerpos de virus sincitial anti-respiratorio (RSV) y anti-FITC en el vector pTT5 fusionando las regiones VL y VH apropiadas a los dominios CL[kappa] y CH1-3 con cambios de Fc. Las construcciones de cadena pesada y ligera fueron co-transfectadas en células HEK293E para expresión, y los anticuerpos fueron purificados usando cromatografía de afinidad de proteína A (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Se obtuvieron las proteínas de receptor de Fc humanas FcγRI y FcγRIIb para estudios de unión y de competición en R&D Systems (Minneapolis, MN). Se obtuvieron los genes que codifican las proteínas de receptor FcγRIIIa y FcγRIIIa en Mammalian Gene Collection (ATCC), y se subclonaron en vector pTT5 (National Research Council, Canadá) que contenía etiquetas 6X His y GST. Se generaron las formas alélicas de los receptores (H131 y R131 para FcγRIIIa y V158 y F158 para FcγRIIIa) usando mutagénesis QuikChange. Los vectores que codifican los receptores fueron transfectados en células HEK293T, y las proteínas fueron purificadas usando cromatografía de afinidad de níquel.

Las variantes fueron sometidas a escrutinio en función de la afinidad de receptor usando tecnología Biacore™, también referida como Biacore en la presente memoria, una tecnología basada en resonancia de plasmón superficial (SPR) para estudiar interacciones moleculares en tiempo real. Se realizaron medidas de SPR usando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se generó un chip biosensor CM5 (Biacore) de proteína A/G (Pierce Biotechnology) usando un protocolo de acoplamiento de amina primaria. Todas las medidas se llevaron a cabo usando tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% v/v de tensioactivo P20, Biacore). Los anticuerpos a 20 nM o 50 nM en tampón HBS-EP fueron inmovilizados sobre la superficie de la proteína A/G y se inyectaron FcγRs. Después de cada ciclo, se regeneró la superficie inyectando tampón de glicina (10 mM, pH 1,5). Los datos fueron procesados para poner a cero el tiempo y la respuesta antes de la inyección de FcγR y restando las señales no específicas apropiadas (canal de respuesta de referencia e inyección de tampón en circulación). Los análisis cinéticos se llevaron a cabo con un ajuste global de datos de unión con un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation (Biacore).

En la Figura 6 se muestra un conjunto representativo de sensogramas correspondientes a la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes seleccionados a FcγRIIb. Las afinidades (Kds de equilibrio) de todas las variantes de la IgG1 WT (nativa) por todos los FcγRs, obtenidas de ajustes de los datos de unión de Biacore, se representan en la Figura 7. Mientras que la Fc de IgG1 WT se une a FcγRIIb con una afinidad de μM (Kd = 1467 nM en la Figura 7), se ha diseñado un gran número de variantes que se unen más fuertemente. Debido a que los anticuerpos evaluados presentan especificidad por CD19 (a través de su región Fv), los resultados de unión de la Figura 7 son debidos únicamente a la unión a FcγRIIb por la región de Fc. Esto se confirma por la falta de unión detectable por las variantes Fc-KO (G236R/L328R y <[Lambda]>236R/L328R), que son eliminadas para unión a todos los FcγRs.

Una cantidad útil para el análisis de las variantes es su tasa de afinidad con respecto a la IgG1 WT, que se obtiene dividiendo la Kd de unión de la IgG1 WT entre la Kd de unión de la variante para cada receptor. Estos resultados de tasa de afinidad se proporcionan en la Figura 8. Una serie de variantes presentan mejoras de la unión a FcγRIIb por encima de 2 logs, y afinidades sustancialmente reducidas o eliminadas por los receptores activantes. En particular, S267E (sustitución individual) así como L235Y/S267E, G236D/S267E, S239D/S267E, S267E/H268E y S267E/L328F (sustituciones dobles) presentan una afinidad por FcγRIIb marcadamente mayor. Adicionalmente, estas variantes presentan una afinidad por el receptor activante FcγRIIIa que es comparable a la IgG1 nativa, mejora modestamente o incluso se ve reducida significativamente.

La Figura 9 muestra una representación de las afinidades de FcγR de variantes seleccionadas en una escala logarítmica, en comparación con las de la IgG1 WT. La variante con la mayor afinidad por FcγRIIb, S267E/L328F, muestra por encima de 2 órdenes de magnitud de incremento en la afinidad a FcγRIIb, y una afinidad significativamente reducida por los receptores activantes, que incluyen FcγRIIIa, FcγRI y H131 FcγRIIIa.

Los datos de las Figuras 9 y 10 indican que las propiedades de las variantes son altamente dependientes, no solo de la posición que es mutada, sino también del aminoácido preciso que es sustituido en cada posición <sup>+</sup>. Por ejemplo, una de las posiciones más fuertes para controlar la afinidad y la selectividad a FcγRIIb respecto a FcγRs activantes es la posición 267. Así, una modificación en esta posición puede dar lugar a resultados drásticamente diferentes dependiendo del aminoácido particular que es sustituido. En particular, tal como se muestra en la Figura 10, mientras que la afinidad de S267E por FcγRIIb se ve mejorada enormemente en relación a la IgG1 WT y proporciona una mejora sustancial de la selectividad a FcγRIIIa, otras sustituciones tales como S267A y S267G proporcionan una mejora marginal o nula para FcγRIIb, y/o poca o ninguna mejora de selectividad relativa a FcγRIIIa. La importancia de la modificación precisa se ve apoyada adicionalmente por el hecho de que dos de las mejores posiciones para potenciar selectivamente la afinidad a FcγRIIb, 236 y 328 (por ejemplo, 236D y 328F) también son las mismas posiciones modificadas para generar la variante Fc-KO (236R y 328R). Estos resultados ilustran la complejidad de la interfaz FcγR, y destacan el reto de diseñar modificaciones que controlen de forma precisa las propiedades de los FcγR.

Muchas de las variantes de combinación de Fc, que incluyen las combinaciones dobles y triples de sustituciones individuales, exhibieron una sinergia (no aditividad) inesperada cuando se comparan con las sustituciones individuales por sí solas. Esto se determinó (para todas las variantes de combinación para las cuales se disponía de datos) comparando la tasa de mejora real de la afinidad medida mediante Biacore frente a la tasa de mejora en la afinidad calculada como el producto de la tasas de mejora de las sustituciones individuales (Figura 11). Como se puede observar a partir de los datos, las sustituciones dobles en los siguientes pares de posiciones dieron como resultado una afinidad mayor a la esperada por uno o más FcγRs: 234/267, 235/267, 236/267, 236/268, 239/267, 239/268, 266/267, 267/328 y 268/327.

A fin de validar los datos de Biacore y de evaluar la unión de receptor de las variantes sobre la superficie celular, se midió la unión de anticuerpos seleccionados a células que expresan FcγRIIb. Puesto que las células HEK293T no expresan CD19 o FcγRs, la transfección de estas células con FcγRIIb permitió un análisis de anticuerpo a receptores de Fc en un sistema aislado sobre la superficie de una célula. Se transfectoron células HEK293T en DMEM con un 10% de FBS con ADNc de FcγRIIb humano en vector de expresión pCMV6 (Origene Technologies, Rockville, MD), cultivadas durante 3 días, cosechadas y lavadas dos veces en PBS, resuspendidas en PBS con un 0,1% de BSA (PBS/BSA), y divididas en alícuotas a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los anticuerpos de variante de Fc fueron diluidos en serie en PBS/BSA y a continuación se añadieron a las células y se incubaron con mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Tras un lavado intensivo con PBS/BSA, se añadió para detección fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-Fab-humano-específico marcado con ficoeritrina (PE). Las células fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas y resuspendidas en PBS/BSA. Se evaluó la unión usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA), y se representó la intensidad de fluorescencia media (MFI) en función de la concentración de anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA) a partir de la cual se determinaron los valores de unión media máxima (EC50) mediante una modelización dosis-respuesta sigmoidea.

Los niveles de expresión de receptor fueron determinados antes de la unión de anticuerpos, y se determinaron los valores de concentración efectiva media máxima (EC50) de las MFI a diferentes concentraciones de anticuerpos. La Figura 12 muestra los resultados de este experimento. Los valores de EC50 de las variantes evaluadas mostraron un orden de rango similar a los resultados de Biacore. La unión en superficie celular confirmó que la variante S267E/L328F presentó la mayor afinidad, entre las evaluadas, por FcγRIIb, con una EC50 de aproximadamente 320 veces mayor a la de IgG1 WT. La estrecha coincidencia entre estos datos de unión en superficie celular y los datos de unión de Biacore confirma la precisión de las medidas de afinidad.

Debido a la importancia de los modelos animales en el desarrollo de fármacos, se realizó un escrutinio de variantes seleccionadas en términos de unión a receptores de ratón y de mono cynomolgus. Las regiones extracelulares de los FcγRs de ratón y de mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) fueron expresadas y purificadas. Las regiones extracelulares de estos receptores fueron obtenidas mediante PCR a partir de clones obtenidos de la "Mammalian Gene Collection" (MGC), o generadas de novo usando PCR recurrente. Para permitir la purificación y el escrutinio, los receptores fueron fusionados C-terminalmente con una etiqueta His y GST. Los FcγRs marcados fueron transfectorados en células 293T, y se recolectó el medio que contenía el receptor secretado 3 días después, y se purificó usando cromatografía de níquel.

Los anticuerpos variantes fueron evaluados en términos de afinidad a FcγRs de ratón o de mono cynomolgus usando Biacore SPR, como se ha descrito anteriormente. Específicamente, los anticuerpos primero fueron inmovilizados sobre un chip de proteína A/G hasta alta densidad, y a continuación se aplicaron inyecciones del dominio extracelular del FcγR de ratón o de mono cynomolgus de interés. Se siguió en tiempo real tanto la fase de asociación como la de disociación usando la tecnología Biacore. La Figura 13 muestra las tasas de mejora (en comparación con la IgG1 WT) por la unión de variantes seleccionadas de FcγRs de ratón y mono cynomolgus determinada a partir de Biacore.

Aunque las variantes fueron sometidas a escrutinio en el contexto de IgG1 humana, se contempla que las variantes podrían usarse en el contexto de otros isotipos de anticuerpo, por ejemplo que incluyen, aunque sin limitación, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana (Figura 1). A fin de explorar la transferibilidad de las variantes a otros

isotipos de anticuerpo, se construyó la variante S267E/L328F y se evaluó en el contexto de un anticuerpo IgG1/2 ELLGG, que es una variante de una región de Fc de IgG2 (USSN 1 1/256.060). Se construyeron las mutaciones, los anticuerpos fueron purificados y los datos de unión se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. La Figura 14 muestra afinidades de los anticuerpos variantes de IgG1 e IgG1/2 a los FcγRs humanos, determinadas mediante Biacore. Los datos indican que la afinidad a FcγRIIb enormemente potenciada y el perfil general de unión a FcγR se mantienen en la región de Fc de IgG2 variante, confirmando de este modo el uso de las variantes en otros contextos de isotipo.

En conjunto, los datos anteriores indican que una serie de variantes diseñadas, en posiciones de Fc específicas, proporcionan las propiedades objetivo, a saber, una afinidad incrementada por FcγRIIb, y una afinidad selectivamente potenciada a FcγRIIb en relación a los receptores activantes FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIa.

Las sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332. En algunas realizaciones, se realizan sustituciones en al menos una o más de las siguientes posiciones no limitantes para potenciar la afinidad a FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328.

Las combinaciones no limitantes de posiciones para hacer sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen: 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328 y 328/332. En algunas realizaciones, las combinaciones de posiciones para hacer sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen, aunque sin limitación: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328.

Las sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen: L234D, L234E, L234W, L235D, L235F, L235R, L235Y, G236D, G236N, G237D, G237N, S239D, S239E, V266M, S267D, S267E, H268D, H268E, A327D, A327E, L328F, L328W, L328Y y I332E. En algunas realizaciones, la combinación de posiciones para hacer sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen, aunque sin limitación: L235Y, G236D, S239D, V266M, S267E, H268D, H268E, L328F, L328W y L328Y.

Las combinaciones de sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen: L234D/S267E, L234E/S267E, L234F/S267E, L234E/L328F, L234W/S239D, L234W/S239E, L234W/S267E, L234W/L328Y, L235D/S267E, L235D/L328F, L235F/S239D, L235F/S267E, L235F/L328Y, L235Y/G236D, L235Y/S239D, L235Y/S267D, L235Y/S267E, L235Y/H268E, L235Y/L328F, G236D/S239D, G236D/S267E, G236D/H268E, G236D/L328F, G236N/S267E, G237D/S267E, G237N/S267E, S239D/S267D, S239D/S267E, S239D/H268D, S239D/H268E, S239D/A327D, S239D/L328F, S239D/L328W, S239D/L328Y, S239D/I332E, S239E/S267E, V266M/S267E, S267D/H268E, S267E/H268D, S267E/H268E, S267E/N325L, S267E/A327D, S267E/A327E, S267E/L328F, S267E/L328I, S267E/L328Y, S267E/I332E, H268D/A327D, H268D/L328F, H268D/L328W, H268D/L328Y, H268D/I332E, H268E/L328F, H268E/L328Y, A327D/L328Y, L328F/I332E, L328W/I332E y L328Y/I332E. En algunas realizaciones, las combinaciones de sustituciones para potenciar la afinidad a FcγRIIb incluyen, aunque sin limitación: L235Y/S267E, G236D/S267E, S239D/H268D, S239D/S267E, S267E/H268D, S267E/H268E y S267E/L328F.

Ejemplo 3. Las inmunoglobulinas inhiben la viabilidad de células B humanas primarias mediada por BCR

Aunque las células B normales tienen una vida media in vivo larga de aproximadamente cinco semanas, su longevidad se ve enormemente reducida in vitro. La estimulación de BCR mediante anticuerpos reticulantes tales como anti-IgM o anti-CD79b contrarresta esta predisposición in vitro hacia la apoptosis, conduciendo a una activación de las células B y a una mayor viabilidad de células B. Para demostrar esto, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad de células B dependiente de ATP. Se purificaron células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMCs) a partir de leucaferesis de voluntarios sanos anónimos (HemaCare, Van Nuys, CA) usando gradientes de densidad Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Newark, NJ). Se purificaron células B humanas primarias procedentes de PBMCs usando un kit de enriquecimiento de células B (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia). Se adquirieron CD79b anti-humanos de ratón (clon SN8) en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se adquirió F(ab')<sub>2</sub> anti-μ policlonal en Jackson ImmunoResearch Lab (West Grove, PA). Se realizaron diluciones en serie de anticuerpos anti-CD79b o anti-μ por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían RPMI1640 con un 10% de FBS. Se añadieron células B humanas primarias purificadas (5-7,5 x 10<sup>4</sup> por pocillo) hasta un volumen final de 100 μL, y se incubaron a 37°C durante 3 días. Se cuantificó la luminiscencia dependiente de ATP para determinar la viabilidad celular (ensayo de viabilidad celular Cell Titer-Glo, Promega, Madison, WI) y se usó un luminómetro Topcount (Perkin Elmer, Waltham, MA) para la adquisición de datos. Las Figuras 15A y 15B muestran los resultados del ensayo, que demuestran la supervivencia de células B humanas primarias tras activación de BCR, aquí llevada a cabo mediante reticulamiento con anticuerpos anti-μ (A) o anti-CD79b (B). In vivo dicha activación se produciría a través de antígeno acoplado inmune, que por ejemplo podría ser un agente infeccioso, o en la causa de una reacción autoinmune o alérgica podría ser un antígeno o alérgeno autoinmune.

Se usó el ensayo de luminiscencia dependiente de ATP para examinar si la viabilidad mediada por activación de BCR de células B humanas primarias podría ser suprimida por un anticuerpo anti-CD19 que tuviera una afinidad de Fc potenciada para FcγRIIb. El anterior experimento fue repetido, excepto que las diluciones en serie de anticuerpo

de los anticuerpos WT, variantes y de control se llevaron a cabo por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían RPMI1640 con un 10% de FBS, más anti-CD79b a una concentración de 1 µg/mL para estimular BCR. Los resultados se muestran en la Figura 16. Nuevamente, las células B presentaron una baja viabilidad en ausencia de reticulamiento de BCR, y la adición de 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD79b estimuló la supervivencia en una tasa de aproximadamente 6 (células solas frente a anti-CD79b). El anti-CD19-S267E/L328F, la variante con la mayor afinidad de FcγRIIb, inhibió la viabilidad estimulada por BCR de un modo dependiente de la dosis. Por el contrario, los anticuerpos de control que incluían anti-CD19-IgG1 (control de Fv) y anti-RSV-S267E/L328F (control de Fc) suprimieron mínimamente la viabilidad. Para determinar si este efecto inhibitorio requería el co-enfrentamiento de CD19 y FcγRIIb, en oposición a la unión simultánea de cada receptor por diferentes anticuerpos, se comparó la variante anti-CD19-S267E/L328F con una combinación de controles anti-CD19-IgG1 y anti-RSV-S267E/L328F en concentraciones iguales. La combinación de estos anticuerpos debería unirse simultáneamente tanto a CD19 como a FcγRIIb pero, al contrario que el anti-CD19-S267E/L328F, fue incapaz de reticular dichos receptores. Tal como se muestra en la Figura 16, la combinación no consiguió suprimir la supervivencia inducida por activación de BCR, lo que indica que el co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 por parte de una única molécula es necesario para inhibir la viabilidad mediada por BCR. No todas las variantes fueron capaces de inhibir la activación de células B. Tal como se demuestra en la Figura 17, las variantes con una afinidad moderadamente incrementada respecto a la IgG1 WT (S267A, 408 nM, tasa de 3,6 respecto a la IgG1 nativa) no inhiben la activación de células B. Por el contrario, los datos de la Figura 18 demuestran que las variantes con elevada afinidad, siendo aquí la afinidad más débil la de la variante S267E (71,9 nM, tasa de 20,4 respecto a la IgG1 nativa), de hecho inhiben la activación. En conjunto, los resultados de las Figuras 18, 19 y 20 sugieren que es necesaria una determinada afinidad por FcγRIIb, de aproximadamente 100 nM, para mediar en la actividad inhibitoria en el co-enfrentamiento de antígeno diana de co-receptor FcγRIIb y BCR.

Ejemplo 4. Las inmunoglobulinas inhiben la activación de BCR de la movilización de calcio en células B humanas primarias a través del co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19

Las señales a través del complejo de receptor de células B finalmente dan como resultado una liberación de calcio, y este mecanismo puede ser inhibitorio por FcγRIIb (Nielsen et al., 2005, *Transfus Med Hemother* 32: 339-347). Se usó la movilización de calcio intracelular como medida cuantitativa de la activación de células B mediada por BCR para evaluar adicionalmente el impacto de las inmunoglobulinas. El presente estudio usó células B primarias procedentes de donantes humanos normales como modelo fisiológicamente más relevante de la señalización de calcio. Adicionalmente, en lugar de estimular principalmente células B vía un anticuerpo anti-IgM, se usó un anticuerpo CD79b anti-humano (Ig[beta]) para inducir la activación de BCR tanto en células nuevas como en células B de memoria.

Se midió la concentración de calcio libre intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mediante citometría de flujo usando un ensayo de calcio Fluo-4 NW (Molecular Probes, Eugene, OR). Se resuspendieron células B humanas purificadas a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL en tampón de ensayo de calcio y se pre-cargaron con colorante Fluo-4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación con anticuerpos de control anti-CD19 o Fc y Fv, las células fueron estimuladas mediante la adición de 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD79b. Se registró la cinética de flujo de calcio usando un citómetro de flujo FACSCanto II y los datos fueron analizados usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

La movilización de calcio en presencia de 10 µg/mL de anticuerpo de Fc de IgG1 nativa anti-CD19 ([alfa]-CD19-nativo-IgG1) se vio incrementada respecto al control de vehículo (Figura 19), como era de esperar del co-enfrentamiento de CD19 y BCR. Por el contrario, las variantes de MbE de IgG1 anti-CD19 (también a 10 µg/mL) inhibieron la movilización de calcio inducida por el reticulamiento de BCR, mostrando la mayor actividad las dos variantes de mayor afinidad. Para determinar la importancia de la unión de CD19 para este efecto, se usó un anticuerpo de control de isotipo de Fc que se une con elevada afinidad a FcγRIIb pero no a CD19; este anticuerpo, referido como [alfa]-FTIC-S267E/L328F en la Figura 19, tiene la cadena pesada de IgG1 S267E/L328F, pero una región de Fv que se une al hapteno FTIC (que no está sobre células B). Respecto al vehículo, este anticuerpo presentó un efecto mínimo sobre la movilización de calcio, lo que indica que se requiere la unión a CD19 para inhibir la movilización de calcio. Se llevó a cabo una extensión dosis-respuesta de este experimento en la que cada punto representa el área bajo la curva de una respuesta individual de movilización de calcio de la Figura 19. Los datos muestran que la potencia y la eficacia de las variantes de MbE se correlacionan con la afinidad por FcγRIIb, lo que es consistente con el ensayo de viabilidad de células B, no mostrando ninguna respuesta de dosis el anti-CD19-Nativo-IgG1 (Figura 20). La relación entre la EC50 de la inhibición de calcio y la afinidad por FcγRIIb se muestra en la Figura 21.

Para determinar si la inhibición observada del flujo de calcio requiere el co-enfrentamiento de FcγRIIb y CD19 por un único anticuerpo, se llevó a cabo un experimento competitivo. Puesto que el FcγRI presenta la mayor afinidad de todos los FcγRs (Figura 9) y compite con FcγRIIb por la unión a IgG (datos no mostrados), se usó un exceso molar de 24 veces de FcγRI soluble (solFcγRI) para bloquear la interacción del anticuerpo con la mayor afinidad ([alfa]-CD19-S267E/L328F) con FcγRIIb (Figura 22). Nuevamente, la movilización de calcio inducida por BCR fue inhibida eficazmente por 10 µg/mL de [alfa]-CD19-S267E/L328F, pero no por [alfa]-CD19-Nativo-IgG1. De forma destacada, la inhibición por la variante de MbE fue eliminada completamente en presencia de FcγRI soluble, lo que indica que el enfrentamiento a FcγRIIb es necesario. Estos resultados indican que la movilización de calcio inducida por BCR

puede ser inhibida mediante un único anticuerpo que se une con elevada afinidad a ambos receptores superficiales, FcγRIIb y CD19.

En conjunto, los resultados de viabilidad de células B y de movilización de calcio sugieren que los anticuerpos de variante de Fc con elevada afinidad por FcγRIIb pueden ser útiles en los métodos para inhibir la activación de células B. Los datos proporcionados indican que la modificación de aminoácidos en las posiciones 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332 puede ser útil para dichos métodos inhibidores. En particular, los datos proporcionados indican que las sustituciones 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E pueden ser útiles para dichos métodos inhibidores.

#### 10 Ejemplo 5. Las inmunoglobulinas inducen la fosforilación de SHIP

La activación de SHIP es un componente posterior dependiente de FcγRIIb de la señalización asociada a ITIM. La capacidad del anticuerpo anti-CD19-S267E/L328F para estimular la fosforilación SHIP (pSHIP) en el contexto de la activación BCR por parte de anticuerpo reticulante anti-CD79b fue determinada usando análisis de transferencia western. Se incubaron células B humanas primarias ( $1 \times 10^7$ ) durante 10 minutos a 22°C con 20 µg/mL de anticuerpos anti-CD79b y 10 µg/mL de anticuerpos anti-CD19, y a continuación se añadió PBS enfriado en hielo. Para el control positivo, se usaron 10 µg/mL de anticuerpo específico anti-FcγRII (AT10) (AbD Sertec (Raleigh, NC) parareticular FcγRIIb, y 20 µg/mL de anticuerpo específico de Fcγ de IgG anti-ratón para reticular AT10 y anti-CD79b. Las células fueron lisadas en tampón RIPA frío (Cell Signaling, Beverly, MA) que contenían cócteles inhibidores de proteasa (Roche, Indianapolis, IN) y fosfatasa (Calbiochem, San Diego, CA) con 2 nM de microcistina (Calbiochem), y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Los lisatos fueron centrifugados a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar los residuos, se fraccionaron mediante SDS-PAGE (NuPAGE Novex, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y se transfirieron a membrana de difluoruro de polivinilideno (Invitrogen Life Technologies). Se llevó a cabo un análisis Western con fosfo-SHIP (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) y anticuerpos primarios específicos de GAPDH (Biovision, Mountain View, CA) usando anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado a HRP con técnicas de imagen por quimioluminiscencia aumentada (Amersham Bioscience, Newark, NJ) y un sistema de captura de imágenes UVP Bioimaging (Upland, CA).

Los datos se presentan en la Figura 23. Las manchas western de los extractos celulares procedentes de células B humanas primarias purificadas demostraron que la variante anti-CD19 HbE estimuló un aumento sustancial del nivel de pSHIP en comparación con IgG1 anti-CD19 y otros controles (anti-RSV-S267E/L328F y anti-CD19-Fc-KO) (Figura 23, calle 1 frente a calles 2-4). Como era de esperar, el reticulamiento directo de FcγRIIb con BCR por parte de anticuerpo anti-FcγRII también mostró un aumento del nivel de pSHIP (calle 5). Estos resultados indican que la supresión de la función de célula B mediante el anticuerpo anti-CD19 MbE estimula la fosforilación SHIP, lo cual es consistente con un mecanismo de señalización conocido del co-enfrentamiento BCR-FcγRIIb.

#### 35 Ejemplo 6. Las inmunoglobulinas inhiben el efecto anti-apoptótico dependiente de BCR en células B humanas primarias

Aunque las células B normales in vivo presentan una larga vida media de aproximadamente 5 semanas, in vitro esta longevidad se ve enormemente reducida, produciéndose un aumento de la apoptosis debido a la falta de un nicho apropiado. La activación de células B vía estimulación de BCR induce un efecto anti-apoptótico y prolonga la viabilidad, como se demuestra en la Figura 15. Para determinar si la actividad antiproliferativa de la variante de MbE fue resultado de neutralizar señales de supervivencia mediadas por BCR, permitiendo de este modo que se produjera la apoptosis in vitro, se llevó a cabo un ensayo de tinción con anexina-V. Se incubaron  $1 \times 10^5$  células B humanas primarias purificadas durante 24 h a 37°C por triplicado con 1 µg/mL de anti-CD79b y diluciones en serie de anticuerpos anti-CD19 o de control en 100 µL de RPMI1640 con un 10% de FBS. Tras la incubación, las células fueron recolectadas y teñidas con anexina-V conjugada a PE (Biovision, Mountain View, CA) y 7-amino-actinomicina D (J-AAD, Invitrogen, Carlsbad, CA) a una concentración de 5 µg/mL. Las células positivas-anexina-V/negativas/7-AAD fueron adquiridas usando un citómetro de flujo FACSCanto II, y se analizaron con software de análisis FACSDiva 5 (BD Biosciences).

Los datos se muestran en la Figura 24. La tinción con anexina-V de células B humanas primarias cultivadas en presencia o en ausencia de anti-CD79b confirmó que la apoptosis era suprimida por la activación de BCR (Figura 24, células solas frente a anti-CD79b). Esta señal de supervivencia fue neutralizada de una manera dependiente de la dosis por anti-CD19-S267E/L328F, pero no por anticuerpos de control de Fc anti-RSV-S267E/L328F o anticuerpos de control de Fv CD19-IgG1. La inhibición del efecto anti-apoptótico, como la inhibición de la movilización de calcio y de la proliferación celular, requiere el co-enfrentamiento de CD19 y FcγRIIb por parte de un único anticuerpo, debido a que la combinación de anti-CD19-IgG1 y anti-RSV-S267E/L328F (controles de Fv y Fc, respectivamente) no estimuló la apoptosis. Estos datos indican que la variante anti-CD19 MbE inhibe la proliferación de células B inducida por BCR a través de la supresión de las señales de supervivencia anti-apoptóticas.

#### Ejemplo 7. Las inmunoglobulinas no median en las funciones efectoras

A fin de evaluar el efecto de modular la afinidad de FcγRIIIa, las inmunoglobulinas fueron examinadas en términos de actividad de ADCC. Se llevaron a cabo diluciones en serie de anticuerpos en placas de microtitulación de 96 pocillos por triplicado y se incubaron con células diana Ramos (10.000 en total) para opsonizar las células diana durante ~15 minutos. Ramos es una línea de células B humanas inmortales derivadas de células de linfoma de Burkitt. Se añadieron en la concentración apropiada células NK purificadas (50.000 en total) usando un kit de selección negativa a partir de PBMC congeladas preparadas a partir del paquete de leucoforesis usando gradiente de densidad Ficoll estándar. La reacción de ADCC en funcionamiento final fue en 100 μL de FBS al 1%/RPMI1640 durante 4 horas a 37°C, tras lo cual se detectó la cantidad de LDH liberada desde las células diana usando un sistema de detección fluorescente. Se determinó el porcentaje de ADCC normalizando la actividad LDH de fondo (diana y NK juntas sin anticuerpo), actividad LDH experimental ajustada contra la actividad LDH total presente en las células diana (actividad LDH espontánea presente en las células diana solas ajustada con TritonXI OO células diana lisadas). Tal como se muestra en la Figura 25, muchas de las variantes con afinidad de FcγRIIb mejorada, pero todavía inferior o equivalente a la afinidad de FcγRIIIa comparada con IgG1 natural, que incluye S267E, G236D/S267E y S267E/L328F, carecen de actividad ADCC. Esto se atribuye a su afinidad reducida o eliminada por los FcγRs, particularmente el FcγRIIIa que es el único FcγR expresado en células NK.

Las inmunoglobulinas también fueron evaluadas para determinar su capacidad para mediar en la fagocitosis por parte de macrófagos. Las células diana fueron células RS4; 11, una línea de células B humanas inmortales derivadas de células de leucemia. Los macrófagos expresan una variedad de FcγRs, que incluyen FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa. Se diferenciaron monocitos purificados en presencia de factor estimulante de colonia de macrófagos durante 5 días en macrófagos. Los macrófagos fueron mezclados con células RS4;11 marcadas fluorescentemente (PKH26) en suero AB humano al 10% en RPMI seguido de la adición de anticuerpos anti-CD19 y fueron incubados durante 4 horas a 37°C. Se añadieron a la mezcla de reacción anticuerpos de CD14 y CD11b conjugados a APC, se lavaron y se fijaron. Se determinó la fagocitosis mediante el porcentaje de CD14+CD11b+ y la población positiva doble PKH26 se dividió por el número total de tumores teñidos. Los datos se muestran en la Figura 26. La IgG1 anti-CD19 y la variante S239D/I332E demostraron fagocitosis. Por el contrario, las variantes con afinidad a FcγRIIb potenciada, aunque redujeron la afinidad por los receptores activantes, incluyendo S267E/L328F y G236D/S267E, tuvieron poca o ninguna actividad fagocítica, comparable al anticuerpo de control que atacaba RSV.

Las inmunoglobulinas también fueron evaluadas para determinar su capacidad para mediar la CDC. Se usó la liberación de azul de alamar para monitorizar la lisis de una línea de células B diana por parte de complemento de suero humano. Se lavaron células Raji (una línea de células B inmortal) en medio FBS al 10% mediante centrifugación y resuspensión, y se cargaron en placas de 96 pocillos a 40.000 células por pocillo. Se añadieron anticuerpos variantes anti-CD19 o de control anti-CD20 Rituxan en diluciones de  $<1>[\text{Lambda}]$  veces hasta las concentraciones finales indicadas. Se diluyó complemento de suero humano (Quidel) 1 a 5 con medio y se añadió a células diana opsonizadas con anticuerpo. Las placas fueron incubadas durante 2 h a 37°C, se añadió azul de alamar, las células se cultivaron durante una noche, y se midió la fluorescencia. Los datos de este ensayo se muestran en la Figura 27. Al contrario que el control anti-CD20, los anticuerpos variantes anti-CD19 no mediaron en la actividad CDC contra células B.

Ejemplo 8. Los datos in vivo demuestran el potencial para tratar trastornos autoinmunes o inflamatorios

Un sello distintivo de la autoinmunidad en ratones y humanos es la desregulación de la expresión de FcγRIIb que da como resultado un menor nivel superficial de este receptor inhibitorio, lo que conduce a un nivel elevado de activación de células B y el consecuente fallo de la inhibición de células B auto-reactivas y la producción de células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas específicas de auto-antígeno. Dichos complejos inmunes de inmunoglobulina auto-reactivos son agentes etiológicos en varios fallos orgánicos en la autoinmunidad sistémica y en otras inflamaciones artríticas tales como el lupus sistémico eritematoso (SLE) y la artritis reumatoide (RA). Las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria fueron evaluadas usando un modelo de ratón huPBL-SCID como representante, examinando la actividad de célula B medida por el número de células B y el desarrollo de células plasmáticas mediante la detección de las inmunoglobulinas específicas de antígeno. En este método, PBLs humanas procedentes de donantes normales o enfermos (p.ej., de SLE o RA) son injertadas en ratones SCID inmunodeficientes y son tratadas con la inmunoglobulina inhibitoria descrita en la presente memoria, a continuación son enfrentadas a un antígeno para examinar el curso del desarrollo de células B en células plasmáticas. En tal caso, la producción de inmunoglobulinas específicas de antígeno es inhibida, de lo que se puede deducir la inhibición tanto de la activación de células B como de la diferenciación de las mismas.

El protocolo para este estudio se proporciona en la Figura 28A. Cuatro grupos diferentes de ratones con cinco ratones en cada grupo fueron injertados con PBLs humanas procedentes de un donante sano. En el día 16, artículos de ensayo que consistían en PBS (control de vehículo), anti-CD19 con Fc de IgG1 nativa (anti-CD19 IgG1 WT), anti-CD19 con Fc de IgG1 con afinidad potenciada por FcγRIIb (anti-CD19 S267E/L328F) o anti-CD20 de IgG1 Rituximab fueron administrados a 10 mg/kg dos veces por semana durante un total de 6 dosis. En el día 24, se realizó una exposición a antígeno con fragmento C de toxoide del tétanos, y los ratones fueron sacrificados en los días 31 y 38. Se examinó la producción de anticuerpos específicos de toxoide del tétanos (TT). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 28B. Los datos muestran que antes de la exposición a antígeno, el nivel de anticuerpos específicos anti-TT era muy bajo en todos los grupos. Tras la inmunización, el grupo de control de

PBS no tratado mostró el nivel más elevado de anticuerpos específicos anti-TT. En comparación, el anticuerpo anti-CD20 agotador de células B produjo un nivel bajo de anticuerpos específicos de antígeno. Tras la inmunización, el grupo anti-CD19 S267E/L328F mostró el nivel más bajo de anticuerpos específicos de antígeno, mientras que el anti-CD19 IgG1 WT produjo un nivel mayor de anticuerpos específicos de antígeno. Estos datos *in vivo* demuestran que el anticuerpo anti-CD19 con afinidad mejorada a FcγRIIb es capaz de inhibir la activación de células B y la diferenciación de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, y por tanto confirman el potencial de las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria para tratar trastornos autoinmunes e inflamatorios.

#### Ejemplo 9. Co-enfrentamiento de FcγRIIb y otros antígenos diana

El uso de anticuerpos para co-enfrentar CD19 y FcγRIIb es un ejemplo de cómo el co-enfrentamiento simultáneo de alta afinidad de un antígeno de célula B y FcγRIIb puede usarse para inhibir la activación o la proliferación de células FcγRIIb+. Como se ha discutido previamente, el FcγRIIb es un regulador negativo de una serie de tipos celulares, que incluyen, aunque sin limitación, células B, células plasmáticas, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos. También se pueden co-enfrentar una variedad de antígenos expresados en estos tipos de células FcγRIIb+ con unión a FcγRIIb de alta afinidad para inhibir la activación celular y/o la proliferación celular. La Figura 29 proporciona una serie de ejemplos de antígenos y tipos de células que pueden ser atacados por las inmunoglobulinas descritas en la presente memoria.

De inicio, no está claro qué antígenos pueden servir como co-dianas efectivas con el FcγRIIb para la modulación de la actividad celular. Un aspecto clave probable de una co-diana potencial es su papel funcional en la célula, y en particular si sus mecanismos de señalización intracelular (si los hay) solapan con los del FcγRIIb. CD19 es un co-receptor del complejo BCR, y por tanto la capacidad de co-enfrentamiento de alta afinidad de CD19 y FcγRIIb para inhibir la activación de células B probablemente está relacionada con la asociación de CD19 con el BCR y el papel regulador negativo del FcγRIIb en la inhibición de la activación estimulada por BCR. Cabe destacar, sin embargo, que CD19 no está implicado en el reconocimiento de antígeno, que es la función específica del componente [μ] (IgM) del BCR. En lugar de CD19, y otras proteínas tales como CD21, CD22, CD72, CD81 y Leu12, son co-receptores de BCR. Por supuesto, el ataque a otros componentes del BCR, que incluyen el dominio de reconocimiento de antígeno ([μ], también referido como IgM), y los dominios de señalización CD79a (Ig[α]) y CD79b (Ig[β]), también está soportado por los datos de la presente memoria. Sin embargo, dados los complejos mecanismos bioquímicos implicados en la regulación de la activación celular y de la proliferación de estos tipos de células, la evaluación de qué antígenos (Figura 29) pueden servir como co-dianas efectivas con FcγRIIb para la modulación de la actividad celular requiere de experimentación.

Para evaluar qué antígenos pueden ser co-dianas efectivas con el FcγRIIb para modular la actividad celular, la variante S267E/L328F (alta afinidad a FcγRIIb), junto con la(s) variante(s) IgG1 WT y Fc-KO (<[λ]>236R/L328R y/o G236R/L328R) fueron clonadas en anticuerpos específicos para una variedad de otros antígenos expresados en células FcγRIIb+, que incluyen CD19, CD20, CD22, CD23, CD40, CD52 y CD79b. En varios casos, se construyeron múltiples Fv's atacando al mismo antígeno para determinar la dependencia de epítipo de los efectos. La Figura 54 enumera las regiones variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) de los anticuerpos usados. Los genes VH y VL que atacan a estos antígenos fueron construidos mediante síntesis génica, y las variantes fueron construidas, expresadas y purificadas como se ha descrito anteriormente.

El efecto de un co-enfrentamiento de alta afinidad de estos antígenos con FcγRIIb se evaluó usando el ensayo de viabilidad de células B de luminiscencia dependiente de ATP como se ha descrito anteriormente. Las Figuras 30-35 muestran los resultados de estos experimentos. Los datos indican que el CD79b también es una co-diana efectiva para usar el co-enfrentamiento de FcγRIIb de alta afinidad para inhibir la activación de células B. Esto es consistente con su papel como componente de señalización del complejo BCR. Los resultados usando dos anticuerpos anti-CD19 adicionales nuevamente confirmaron la adecuación de este antígeno para controlar la activación de células B usando una co-ligación de FcγRIIb de alta afinidad, independientemente del epítipo específico atacado. Por el contrario, no se observó ningún efecto de co-enfrentamiento de FcγRIIb de alta afinidad para los anticuerpos con especificidad por CD20, CD23 y CD52. Inesperadamente, el ataque dual de FcγRIIb usando anticuerpos que tienen especificidad por CD22 y CD40 dio como resultado un aumento de la activación de células B. En el caso del CD22, esto puede deberse a su función como regulador negativo para la activación de BCR. En el caso del CD40, esto puede deberse a su función como regulador positivo de la activación de células B a través del enfrentamiento en la interfaz de células T. Es sabido que algunos de los anticuerpos usados son agonistas, es decir, que su unión a CD40 sobre células B y otras células promueve la señalización positiva y la activación de células B. En cierto sentido, estos anticuerpos están imitando la señal de co-activación de una célula T. La dependencia de anticuerpo (y por tanto de epítipo) de esta activación probablemente está relacionada con la capacidad de los anticuerpos para agonizar. La razón para el incremento del agonismo y la estimulación de las células B tras un enfrentamiento de alta afinidad (S267E/L328F) de FcγRIIb, pero no usando IgG1 WT o Fc-KO, aún no está clara, y requiere estudios adicionales.

Anticuerpos seleccionados dirigidos a otros antígenos fueron evaluados también en términos de su capacidad para inhibir la movilización de calcio intracelular usando el ensayo descrito anteriormente. Los resultados de la Figura 36 coinciden bien con los datos del ensayo de viabilidad de células B. Mientras que la co-ligación de alta afinidad de FcγRIIb y CD23 no tuvo ningún efecto sobre la movilización de calcio, el CD79b es una co-diana efectiva para la

inhibición de calcio. La co-ligación de FcγRIIb de alta afinidad con CD22 y CD40 dio como resultado un aumento de la movilización de calcio, nuevamente en consonancia con los resultados de viabilidad.

Para realizar un escrutinio con un conjunto mayor de antígenos usando reactivos comerciales, se desarrolló un nuevo método para evaluar la capacidad del co-enfrentamiento FcγRIIb/antígeno para inhibir la actividad celular. Esta estrategia usa una versión haptenizada de un anticuerpo o ligando que tiene especificidad por el antígeno diana, junto con versiones variantes de un anticuerpo anti-hapteno. Este concepto se ilustra en la Figura 37. En la técnica se conoce una variedad de haptenos que pueden usarse para esta estrategia, que incluyen, aunque sin limitación, FITC, biotina y nitrofenilo.

Los genes VH y VL del anticuerpo anti-FITC 4-4-20 fueron construidos mediante síntesis génica, y se construyeron variantes con afinidad potenciada por FcγRIIb (S267E/L328F), junto con IgG1 WT y variante(s) de FcγR bloqueado (<math>\lambda</math>236R/L328R y/o G236R/L328F). Se construyeron anticuerpos, se expresaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Se adquirieron anticuerpos comerciales dirigidos contra los antígenos  $\mu$  ([ $\mu$ ]), CD19, CD20, CD21, CD24, CD35, CD45RA, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y HLA-DR en Beckman Coulter (Fullerton, CA), BD Pharmingen (San Jose, CA), AbD Serotec (Raleigh, NC) o GenTex, Inc. (San Antonio, TX). El reactivo de marcado FITC (Pierce Biotech, Inc., Rockford, IL) se usó para marcar los anticuerpos comerciales según el protocolo suministrado a temperatura ambiente o a 37°C durante 1 hora. Tras el marcado, la marca sin reaccionar fue eliminada usando columnas BioSpin P-6 o P-30 de BioRad (Hercules, CA) y se usó con concentraciones variables de anticuerpos anti-FITC en experimentos de proliferación, como se ha descrito anteriormente.

La eficacia de la estrategia de hapteno para realizar el escrutinio de antígenos fue confirmada primeramente usando anticuerpos anti- $\mu$  y anti-CD19, dos antígenos conocidos por mediar en la actividad inhibidora tras un co-enfrentamiento de alta afinidad con FcγRIIb. Las Figuras 38 y 39 muestran que las variantes de anticuerpo anti-FITC con alta afinidad por FcγRIIb, pero no por IgG1 WT o las variantes Fc-KO, son capaces de inhibir la activación de células B en presencia de anticuerpos anti- $\mu$  y anti-CD19 marcados con FITC. Estos datos son consistentes con la estrategia anterior en donde las variantes eran incorporadas directamente en el anticuerpo con especificidad por CD19 o  $\mu$ , y de este modo confirman el uso de la estrategia de hapteno para realizar el escrutinio de antígenos diana en función de su capacidad para modular la actividad celular tras un co-enfrentamiento de alta afinidad con FcγRIIb.

Las Figuras 40-52 muestran datos de viabilidad de células B por luminiscencia dependiente de ATP usando las versiones de variante de Fc de anticuerpos anti-FITC y anticuerpos dirigidos a CD20, CD21, CD24, CD35, CD45RA, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD86 y HLA-DR. Se observó actividad inhibidora para el ataque a CD79a y CD79b, en consonancia con su papel en la señalización de BCR. El ataque a CD81 y HLA-DR dio como resultado una posible inhibición. El papel del CD81 como co-receptor de BCR parecería apoyar el resultado para este antígeno. La adecuación de estos antígenos como co-dianas para controlar la activación celular usando unión de FcγRIIb de alta afinidad requiere más estudio. Se observó actividad estimuladora para el co-ataque a CD72 con afinidad de FcγRIIb de alta afinidad.

La Figura 53 proporciona un resumen de los resultados del escrutinio de antígeno diana tanto de la estrategia de variante de Fc como de la estrategia de hapteno. Los datos indican que las inmunoglobulinas que se co-enfrentan con alta afinidad tanto a FcγRIIb como a [ $\mu$ ], CD19, CD79a, CD79b, CD81 y HLA-DR, tienen potencial para inhibir la activación de células FcγRIIb+. Los datos también indican que las inmunoglobulinas que se co-enfrentan con alta afinidad tanto a FcγRIIb como a CD22, CD40 y CD72 tienen potencial para estimular células FcγRIIb+. En global, los resultados de este trabajo sugieren que el enfrentamiento simultáneo de alta afinidad de FcγRIIb y antígenos implicados o asociados al complejo BCR, que incluyen [ $\mu$ ], CD79a, CD79b, CD19, CD21, CD22, CD72, CD81 y Leu13, son métodos para controlar la activación, proliferación y/o viabilidad de células B.

**REIVINDICACIONES**

1. Una inmunoglobulina anti-CD19 que tiene afinidad por CD19 en una célula B, que comprende:  
una cadena ligera;  
una cadena pesada que comprende una región de Fc humana que tiene al menos dos modificaciones de aminoácido en la región de Fc en comparación con el polipéptido Fc original de partida, comprendiendo las al menos dos modificaciones de aminoácido las sustituciones S267E y L328F, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat, y  
en donde la inmunoglobulina se une a FcγRIIb y se co-enfrenta a CD19 sobre la superficie de la célula y a un FcγRIIb sobre la superficie de la célula.
- 5
- 10 2. La inmunoglobulina según la reivindicación 1, que comprende:  
una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y  
una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
3. La inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:  
una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y
- 15 una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
4. Una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Un ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera y una secuencia de cadena pesada según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 20 6. La inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como medicamento.

Figura 1A

CH1																					
Indice EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S
Indice EU	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
IgG1	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG2	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG3	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
IgG4	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N
Indice EU	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
IgG1	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG2	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG3	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG4	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
Indice EU	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201
IgG1	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N
IgG2	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	N	F	G	T	Q	T	Y	I	C	N
IgG3	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N
IgG4	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	I	C	N
Indice EU	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220		
IgG1	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C		
IgG2	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R	K	C	C		
IgG3	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L	K	T	P		
IgG4	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K	Y	G		
Bisagra										Fc >											
Indice EU	221	222			223	224	225	226	227	228											
IgG1	D	K			T	H	T	C	P	P											
IgG2		V			T	E	C	P	P												
IgG3	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P
IgG4		P			P	C	P	S													
Indice EU																					
IgG1																					
IgG2																					
IgG3	P	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R	C	P
IgG4																					
Indice EU																					
IgG1																					
IgG2																					
IgG3	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R								
IgG4																					

Figura 1B

CH2	
Indice EU	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257
IgG1	Q P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG2	G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG3	Q P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG4	Q P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
Indice EU	258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278
IgG1	E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
IgG2	E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y
IgG3	E V T C V V V D V S H E D P E Y Q F K W Y
IgG4	E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y
Indice EU	279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
IgG1	V D G Y E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
IgG2	V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T
IgG3	V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
IgG4	V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T
Indice EU	300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320
IgG1	Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
IgG2	R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
IgG3	R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
IgG4	Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
Indice EU	321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340
IgG1	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG2	C K V S N K Q L P A P I E K T I S K K
IgG3	C K V S N K A L P A P I E K T I S K K
IgG4	C K V S N K Q L P S S I E K T I S K A K
CH3	
Indice EU	341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361
IgG1	G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N
IgG2	G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
IgG3	G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
IgG4	G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E E M T K N
Indice EU	362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382
IgG1	Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG2	Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG3	Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG4	Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
Indice EU	383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403
IgG1	S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D O S
IgG2	S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D O S
IgG3	S S G Q P E N N Y N T T P P M L D S D O S
IgG4	S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D O S
Indice EU	404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424
IgG1	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
IgG2	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
IgG3	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
IgG4	F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S
Indice EU	425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445
IgG1	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG2	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG3	C S V M H E A L H N R F T Q K S L S L S P
IgG4	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L
Indice EU	446 447
IgG1	G K
IgG2	G K
IgG3	G K
IgG4	G K

Figura 2A

Alotipo	Alotipo	Posición		
		214	356 358	431
G1m(1,17)	G1m(a,z)	K	D L	A
G1m(1,2,17)	G1m(a,x,z)	K	D L	G
G1m(3)	G1m(f)	R	E M	A
G1m(1,3)	G1m(a,f)	R	D L	A

Figura 2B

Alotipo	Alotipo	Posición
		282
G2m(23)	G2m(n+)	V
	G2m(n-)	M

Figura 3

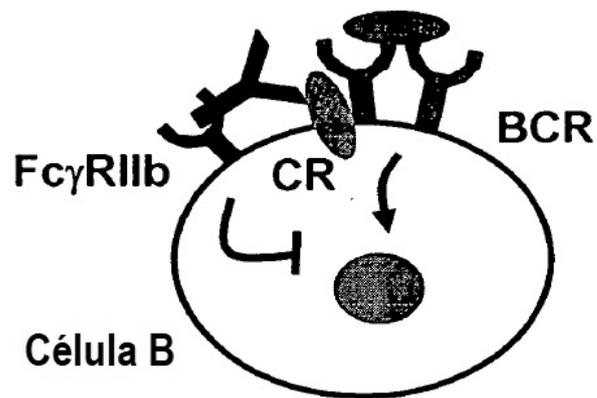


Figura 4

Posiciones FcγR que contribuyen a la selectividad de unión FcγRIIb:FcγRIIIa					
Posición	FcγRIIb humano	FcγRIIIa(V) humano	Posición	FcγRIIb humano	FcγRIIIa(V) humano
116	V	H	113	K	T
154	N	L	152	T	R
159	L	N	158	T	K
86	E	G	112	D	N
157	Y	S	126	S	G
132	S	H	19	E	K
130	S	F	129	F	Y
114	P	A	127	K	R
131	R	H	18	Q	E
134	P	S	60	N	V
160	Y	V	150	H	F
85	S	I	59	N	T

Figura 5

Posiciones de IgG que contribuyen a la selectividad de unión FcγRIIb:FcγRIIIa									
Posición	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Posición	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
236	G	-	G	G	269	E	E	E	E
237	G	G	G	G	266	V	V	V	V
235	L	A	L	L	332	I	I	I	I
329	P	P	P	P	325	N	N	N	N
298	S	S	S	S	270	D	D	D	D
239	S	S	S	S	268	H	H	H	Q
265	D	D	D	D	326	K	K	K	K
327	A	G	A	G	331	P	P	P	S
330	A	A	A	S	264	V	V	V	V
297	N	N	N	N	233	E	P	E	E
267	S	S	S	S	240	V	V	V	V
234	L	V	L	F	241	F	F	F	F
238	P	P	P	P	263	V	V	V	V
299	T	T	T	T	300	Y	F	F	Y
328	L	L	L	L					

Figura 6

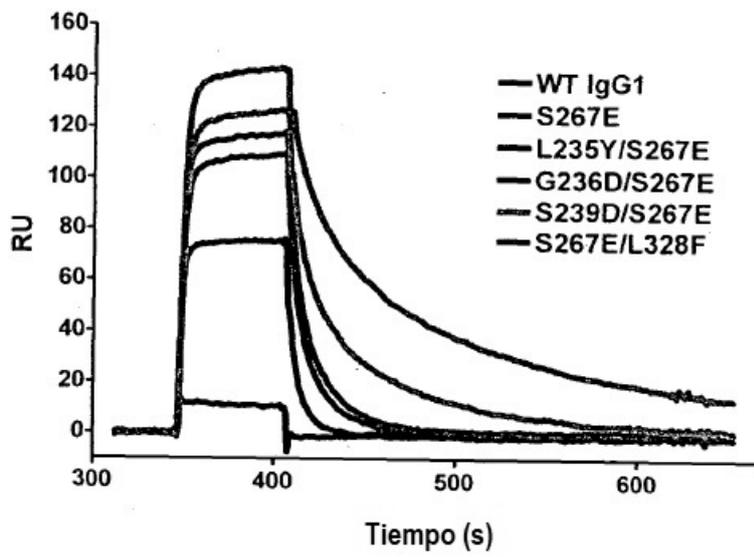


Figura 7

Sustitución(es)	FcγRI Kd (pM)	FcγRIIIaH Kd (nM)	FcγRIIIaR Kd (nM)	FcγRIIb Kd (nM)	FcγRIIIaV Kd (nM)	FcγRIIIaF Kd (nM)
IgG1 WT	329	646	859	1467	191	1352
L234D/G236N/S267E			1180	287		
L234D/S267E	11500		67.7	67.8	1370	
L234E/H268D				249		
L234E/S267E	2510	n.d.	80.4	97	n.d.	
L234E/S267E/L328F	7750	8920	4.93	7.53	n.d.	
L234F	9110	n.d.	3760	3590	n.d.	
L234F/G236N			n.d.	n.d.		
L234F/S236D			n.d.	n.d.		
L234F/S267E	498	1270	41.6	55.7	2040	
L234G			10000	10000		
L234I			15500	13600		
L234K			100000	100000		
L234N			n.d.	n.d.		
L234P			60700	22800		
L234Q			23100	10000		
L234S			1240	7640		
L234V			6425	3221		
L234W	10500	1160	1897	1771	6590	
L234W/G236D/S239E/S267E			151	129		
L234W/H268D/L328Y				248		
L234W/L328Y/I332E				232		
L234W/S239D/L328Y				44.8		
L234W/S239E/S267E			8.72	34.7		
L234Y			16800	61900		
L235A	18400	13300	5178	4183	609	
L235D/S239D				357		
L235D/S267E	854000	n.d.	66.1	88.1	n.d.	
L235D/S267E/L328F	573000	2350	6.45	18.2	n.d.	
L235E			2580	2668		
L235F/H268D/L328Y				370		
L235F/L328Y/I332E				443		
L235F/S239D/L328Y				215		
L235F/S267E	18700	1610	26.4	51.7	n.d.	
L235H			1136	1998		
L235I	16700	3580	1289	1615	212	
L235N			24100	10000		
L235P			7013	251022		
L235Q			420	n.d.		
L235R			838	263		
L235S			100000	100000		
L235S/S267E			1200	37800		
L235T/S267E			281	619		
L235W			n.d.	n.d.		
L235Y	142000	479	669	1400	380	
L235Y/G236D/S267E	n.d.	n.d.	88.8	58.7	n.d.	
L235Y/S239D/S267E	307	617	8.68	12.6	73.5	

ES 2 659 517 T3

Sustitución(es)	F <sub>cγ</sub> RI Kd (pM)	F <sub>cγ</sub> RIIaH Kd (nM)	F <sub>cγ</sub> RIIaR Kd (nM)	F <sub>cγ</sub> RIIb Kd (nM)	F <sub>cγ</sub> RIIaV Kd (nM)	F <sub>cγ</sub> RIIaF Kd (nM)
L235Y/S267D				92.2		
L235Y/S267E	95000	687	22.9	39.4	n.d.	
L235Y/S267E/H268E	32100	4130	17.8	21	447	
L235Y/S267E/L328F	75539	853	5.02	7.83	n.d.	
G236A/G237A				25400		
G236D	15631	3871	1133	953	n.d.	n.d.
G236D/H268D				126		
G236D/S239D/S267E	4810	2980	32.2	17.3	n.d.	
G236D/S267E	3705	2728	34.0	26.6	579	n.d.
G236D/S267E/H268E	3650	6300	28.7	13.4	n.d.	
G236D/S267E/L328F	4478	21500	14.3	9.87	n.d.	
G236E/S267E			23.5	129		
G236F			100000	100000		
G236H			6350	n.d.		
G236I			n.d.	n.d.		
G236K			100000	100000		
G236L			n.d.	n.d.		
G236M			10000	10000		
G236N/S267E	9270	n.d.	263	74.2	n.d.	
G236P			10000	10000		
G236Q			10000	10000		
G236R			100000	100000		
G236S	12300	172	369	1441	52200	
G236S/G237A				18400		
G236T	21000	1330	2456	651920	n.d.	
G236V			8080	100000		
G236W			10000	10000		
G236Y			n.d.	n.d.		
G237A	30500	n.d.	1220	7676	n.d.	
G237D/S267E	3770	n.d.	63.1	86.1	n.d.	
G237E			100000	100000		
G237H			n.d.	n.d.		
G237K			100000	100000		
G237L			n.d.	n.d.		
G237N/S267E	3250		14	36.2	n.d.	
G237P			100000	100000		
G237Q			10000	10000		
G237S			10600	10000		
G237V			25100	10000		
G237Y			952	4450		
S239D	93.4	590	230	408	23.5	214
S239D/A327D/L328Y				123		
S239D/H268D				102		
S239D/H268D/L328F				167		
S239D/H268D/L328F/I332E				27.6		
S239D/H268D/L328W				28.7		
S239D/H268D/L328W/I332E				52.7		
S239D/H268D/L328Y				60.1		
S239D/H268D/L328Y/I332E				27.1		

ES 2 659 517 T3

Sustitución(es)	F <sub>cyRI</sub> Kd (pM)	F <sub>cyRIIaH</sub> Kd (nM)	F <sub>cyRIIaR</sub> Kd (nM)	F <sub>cyRIIb</sub> Kd (nM)	F <sub>cyRIIaV</sub> Kd (nM)	F <sub>cyRIIaF</sub> Kd (nM)
S239D/H268E/L328Y				67.7		
S239D/I332E	37.4	163	68.6	101	7.07	28.2
S239D/K326D/L328Y				113		
S239D/L328F/I332E				176		
S239D/L328Y				264		
S239D/L328Y/I332E				198		
S239D/S267A/L328Y				74.1		
S239D/S267D				65.9		
S239D/S267E	14.2	510	7.16	13.3	51.2	516
S239D/S267E/H268E	326	817	7.52	6.91	18.6	
S239D/S267E/I332E				11.8		
S239D/S267E/L328F	227	378	2.06	3.43	887	
S239E	200	1320	1249	1828	54.8	
S239N			990	1013		
S239Q			1007	2012		
D265E			2794	3517		
V266D			1220	10000		
V266I			n.d.	n.d.		
V266M	264	553	274	770	350	
V266M/S267E	166	59.2	28	50.2	4270	
S267A	287	530	200	408	201	
S267A/H268D/L328Y				137		
S267A/L328Y/I332E				109		
S267D	156	695	95.5	330	127	
S267D/A327D				213		
S267D/A327E				121		
S267D/H268D				103		
S267D/H268E				82.6		
S267E	117	859	29.1	71.9	503	n.d.
S267E/A327D	198		51.3	69.1	96300	
S267E/A327E	143	243	29.3	47.5	21400	
S267E/H268D				44		
S267E/H268E	93.5	845	20.6	36.1	60.8	
S267E/H268E/L328F	333	783	3.4	4.26	2080	
S267E/L328F	220	923	3.12	6.06	5040	n.d.
S267E/L328H			185	284		
S267E/L328I			11.6	27.5		
S267E/L328Q				121		
S267E/L328Y	1470	481	7.06	34.1	n.d.	
S267E/N325L			20.7	46.6		
S267G	626	2120	517	1450	2120	
H268D	140	342	205	480	62.2	
H268D/A327D				191		
H268D/A327D/L328Y				420		
H268D/K326D/L328Y				78.9		
H268D/L328F/I332E				119		
H268D/L328W/I332E				36.9		
H268D/L328Y				767		
H268D/L328Y/I332E				300		

Sustitución(es)	FcγRI Kd (pM)	FcγRIIaH Kd (nM)	FcγRIIaR Kd (nM)	FcγRIIb Kd (nM)	FcγRIIIaV Kd (nM)	FcγRIIIaF Kd (nM)
H268E	120	453	269	560	87.5	
H268E/L328Y/I332E				172		
H268N			481	1250		
H268Q			544	n.d.		
S298D			592	1840		
S298E			n.d.	n.d.		
S298L				n.d.		
S298M				n.d.		
S298Q			n.d.	n.d.		
K326A				n.d.		
K326D/L328Y/I332E				553		
K326E				241		
K326W				483		
A327D	160	882	536	1100	481	
A327D/L328Y/I332E				636		
A327G			2692	4159		
A327L				n.d.		
A327N	11800	n.d.	1410	1740	n.d.	
A327Q			1354	133661		
L328E				n.d.		
L328F	452	2360	166	541	58408	5109
L328Y/I332E				705		
P329E			10000	10000		
A330D				n.d.		
A330H				n.d.		
A330K				947		
A330S				23100		
P331S				39400		
IgG1/2ELLGG	161	428	481	563	667	
IgG1/2ELLGG_S267E/L328F	140	651	3.19	6.63	n.d.	
G236R/L328R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
^236R/L328R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Figura 8

Sustitución(es)	Tasa FcγRI	Tasa FcγRIIaH	Tasa FcγRIIaR	Tasa FcγRIIb	Tasa FcγRIIIaV	Tasa FcγRIIIaF
IgG1 WT	1	1	1	1	1	1
L234D/G236N/S267E			0.728	5.11		
L234D/S267E	0.0286		12.7	21.7	0.14	
L234E/H268D				5.89		
L234E/S267E	0.131	n.d.	10.7	15.1	n.d.	
L234E/S267E/L328F	0.0425	0.0725	174	195	n.d.	
L234F	0.0362	n.d.	0.228	0.409	n.d.	
L234F/G236N			n.d.	n.d.		
L234F/S236D			n.d.	n.d.		
L234F/S267E	0.661	0.509	20.7	26.4	0.0938	
L234G			0.0859	0.147		
L234I			0.0554	0.108		
L234K			0.00859	0.0147		
L234N			n.d.	n.d.		
L234P			0.0141	0.0644		
L234Q			0.0372	0.147		
L234S			0.693	0.192		
L234V			0.134	0.456		
L234W	0.0314	0.557	0.453	0.829	0.029	
L234W/G236D/S239E/S267E			5.69	11.4		
L234W/H268D/L328Y				5.92		
L234W/L328Y/I332E				6.32		
L234W/S239D/L328Y				32.8		
L234W/S239E/S267E			98.5	42.3		
L234Y			0.0511	0.0237		
L235A	0.0179	0.0486	0.166	0.351	0.314	
L235D/S239D				4.11		
L235D/S267E	0.00039	n.d.	13	16.7	n.d.	
L235D/S267E/L328F	0.00057	0.275	133	80.4	n.d.	
L235E			0.333	0.55		
L235F/H268D/L328Y				3.97		
L235F/L328Y/I332E				3.31		
L235F/S239D/L328Y				6.82		
L235F/S267E	0.0176	0.402	32.5	28.4	n.d.	
L235H			0.756	0.734		
L235I	0.0197	0.181	0.666	0.908	0.903	
L235N			0.0356	0.147		
L235P			0.122	0.00585		
L235Q			2.04	n.d.		
L235R			1.02	5.58		
L235S			0.00859	0.0147		
L235S/S267E			0.716	0.0388		
L235T/S267E			3.06	2.37		
L235W			n.d.	n.d.		
L235Y	0.00232	1.35	1.28	1.05	0.504	
L235Y/G236D/S267E	n.d.	n.d.	9.67	25	n.d.	
L235Y/S239D/S267E	1.07	1.05	98.9	116	2.6	
L235Y/S267D				15.9		

Sustitución(es)	Tasa FcγRI	Tasa FcγRIIaH	Tasa FcγRIIaR	Tasa FcγRIIb	Tasa FcγRIIIaV	Tasa FcγRIIIaF
L235Y/S267E	0.00347	0.941	37.5	37.2	n.d.	
L235Y/S267E/H268E	0.0103	0.157	48.2	69.9	0.428	
L235Y/S267E/L328F	0.00436	0.758	171	187	n.d.	
G236A/G237A				0.0578		
G236D	0.0211	0.167	0.758	1.54	n.d.	n.d.
G236D/H268D				11.6		
G236D/S239D/S267E	0.0685	0.217	26.7	84.8	n.d.	
G236D/S267E	0.0889	0.237	25.2	55.1	0.331	n.d.
G236D/S267E/H268E	0.0902	0.103	29.9	110	n.d.	
G236D/S267E/L328F	0.0736	0.0301	59.9	149	n.d.	
G236E/S267E			36.5	11.4		
G236F			0.00859	0.0147		
G236H			0.135	n.d.		
G236I			n.d.	n.d.		
G236K			0.00859	0.0147		
G236L			n.d.	n.d.		
G236M			0.0859	0.147		
G236N/S267E	0.0355	n.d.	3.27	19.8	n.d.	
G236P			0.0859	0.147		
G236Q			0.0859	0.147		
G236R			0.00859	0.0147		
G236S	0.0268	3.76	2.33	1.02	0.00367	
G236S/G237A				0.0797		
G236T	0.0157	0.486	0.35	0.00225	n.d.	
G236V			0.106	0.0147		
G236W			0.0859	0.147		
G236Y			n.d.	n.d.		
G237A	0.0108	n.d.	0.704	0.191	n.d.	
G237D/S267E	0.0874	n.d.	13.6	17	n.d.	
G237E			0.00859	0.0147		
G237H			n.d.	n.d.		
G237K			0.00859	0.0147		
G237L			n.d.	n.d.		
G237N/S267E	0.101		61.5	40.5	n.d.	
G237P			0.00859	0.0147		
G237Q			0.0859	0.147		
G237S			0.081	0.147		
G237V			0.0342	0.147		
G237Y			0.902	0.33		
S239D	3.53	1.1	3.73	3.6	8.14	6.32
S239D/A327D/L328Y				11.9		
S239D/H268D				14.4		
S239D/H268D/L328F				8.79		
S239D/H268D/L328F/I332E				53.2		
S239D/H268D/L328W				51.1		
S239D/H268D/L328W/I332E				27.8		
S239D/H268D/L328Y				24.4		
S239D/H268D/L328Y/I332E				54.1		
S239D/H268E/L328Y				21.7		
S239D/I332E	8.81	3.98	12.5	14.6	27.1	48

Sustitución(es)	Tasa FcγRI	Tasa FcγRIIaH	Tasa FcγRIIaR	Tasa FcγRIIb	Tasa FcγRIIIaV	Tasa FcγRIIIaF
S239D/K326D/L328Y				13		
S239D/L328F/I332E				8.34		
S239D/L328Y				5.56		
S239D/L328Y/I332E				7.41		
S239D/S267A/L328Y				19.8		
S239D/S267D				22.3		
S239D/S267E	23.2	1.27	120	111	3.74	2.62
S239D/S267E/H268E	1.01	0.791	114	212	10.3	
S239D/S267E/I332E				124		
S239D/S267E/L328F	1.45	1.71	416	428	0.216	
S239E	1.65	0.49	0.688	0.803	3.49	
S239N			0.867	1.45		
S239Q			0.853	0.729		
D265E			0.307	0.417		
V266D			0.704	0.147		
V266I			n.d.	n.d.		
V266M	1.25	1.17	3.13	1.91	0.547	
V266M/S267E	1.98	10.9	30.7	29.2	0.0448	
S267A	1.15	1.22	4.29	3.6	0.952	
S267A/H268D/L328Y				10.7		
S267A/L328Y/I332E				13.5		
S267D	2.11	0.93	8.99	4.45	1.51	
S267D/A327D				6.89		
S267D/A327E				12.1		
S267D/H268D				14.2		
S267D/H268E				17.8		
S267E	2.81	0.753	29.5	20.4	0.381	n.d.
S267E/A327D	1.66		16.7	21.2	0.00199	
S267E/A327E	2.3	2.66	29.3	30.9	0.00894	
S267E/H268D				33.3		
S267E/H268E	3.52	0.765	41.7	40.6	3.15	
S267E/H268E/L328F	0.991	0.826	253	344	0.092	
S267E/L328F	1.5	0.7	275	242	0.038	n.d.
S267E/L328H			4.64	5.17		
S267E/L328I			74	53.4		
S267E/L328Q				12.1		
S267E/L328Y	0.224	1.34	122	43.1	n.d.	
S267E/N325L			41.5	31.5		
S267G	0.526	0.305	1.66	1.01	0.0903	
H268D	2.35	1.89	4.19	3.06	3.08	
H268D/A327D				7.68		
H268D/A327D/L328Y				3.49		
H268D/K326D/L328Y				18.6		
H268D/L328F/I332E				12.3		
H268D/L328W/I332E				39.8		
H268D/L328Y				1.91		
H268D/L328Y/I332E				4.89		
H268E	2.74	1.43	3.19	2.62	2.19	
H268E/L328Y/I332E				8.53		
H268N			1.79	1.17		

Sustitución(es)	Tasa FcγRI	Tasa FcγRIIaH	Tasa FcγRIIaR	Tasa FcγRIIb	Tasa FcγRIIIaV	Tasa FcγRIIIaF
H268Q			1.58	n.d.		
S298D			1.45	0.797		
S298E			n.d.	n.d.		
S298L				n.d.		
S298M				n.d.		
S298Q			n.d.	n.d.		
K326A				n.d.		
K326D/L328Y/I332E				2.65		
K326E				6.09		
K326W				3.04		
A327D	2.06	0.733	1.6	1.33	0.398	
A327D/L328Y/I332E				2.31		
A327G			0.319	0.353		
A327L				n.d.		
A327N	0.0279	n.d.	0.609	0.843	n.d.	
A327Q			0.634	0.011		
L328E				n.d.		
L328F	0.728	0.274	5.16	2.71	0.00328	0.265
L328Y/I332E				2.08		
P329E			0.0859	0.147		
A330D				n.d.		
A330H				n.d.		
A330K				1.55		
A330S				0.0635		
P331S				0.0372		
IgG1/2ELLGG	2.05	1.51	1.79	2.61	0.287	
IgG1/2ELLGG_S267E/L328F	2.35	0.993	269	221	n.d.	
G236R/L328R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
^236R/L328R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Figura 9

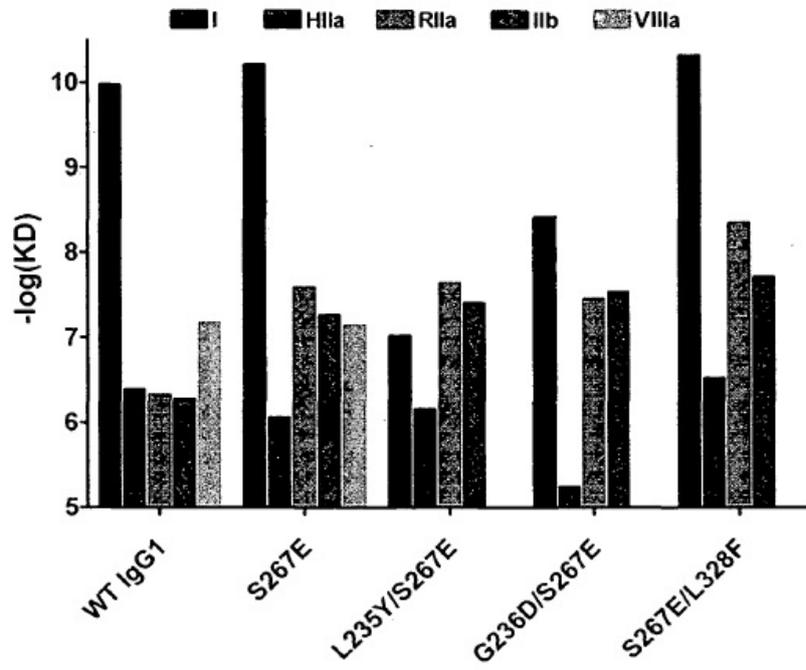


Figura 10

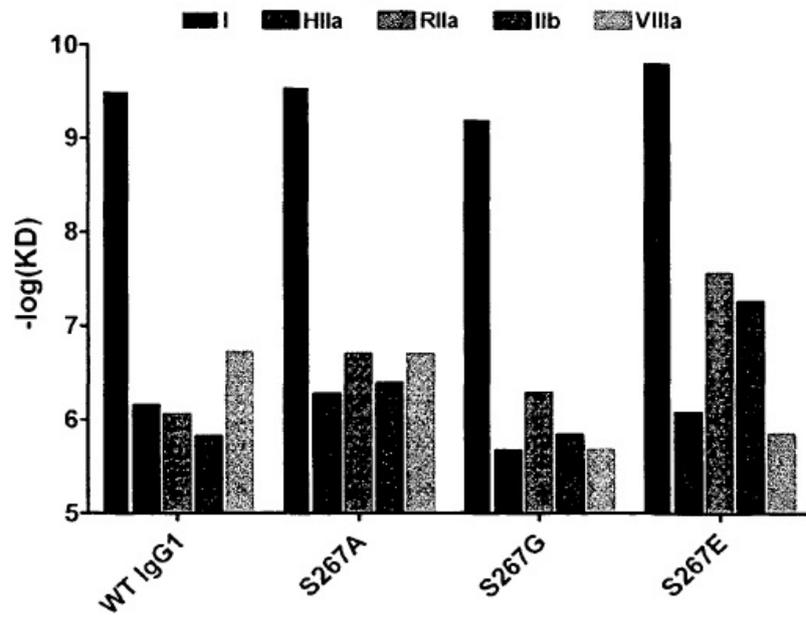


Figura 11A

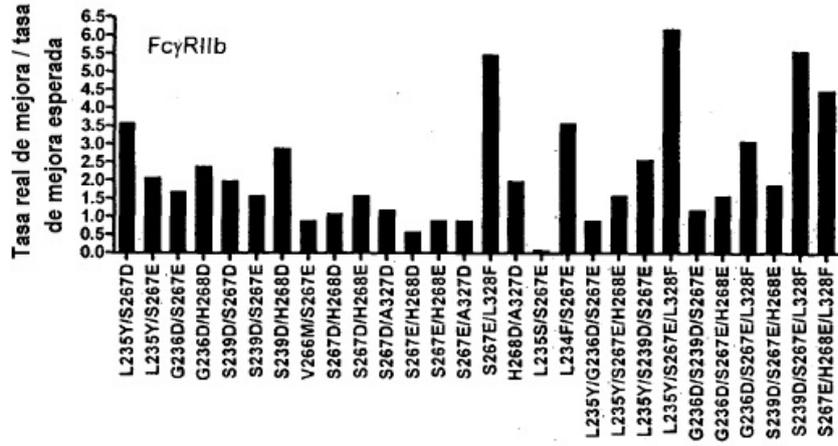


Figura 11B

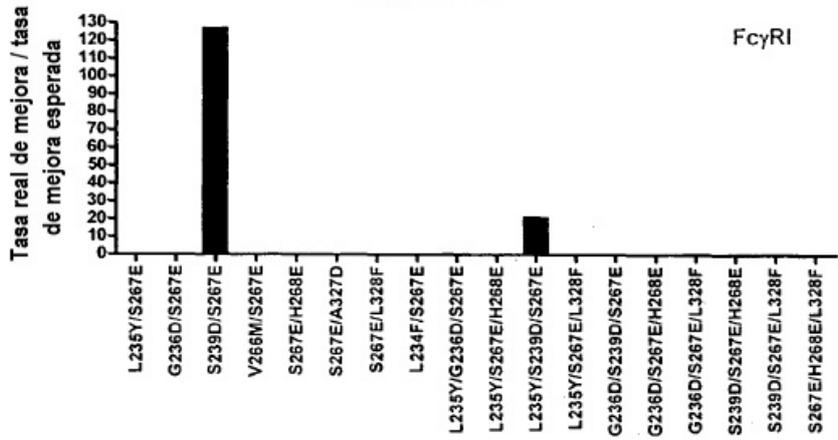


Figura 11C

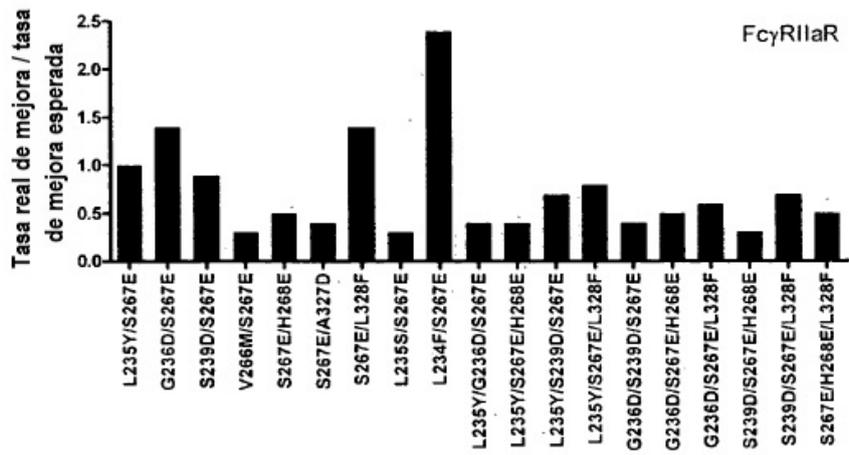


Figura 11D

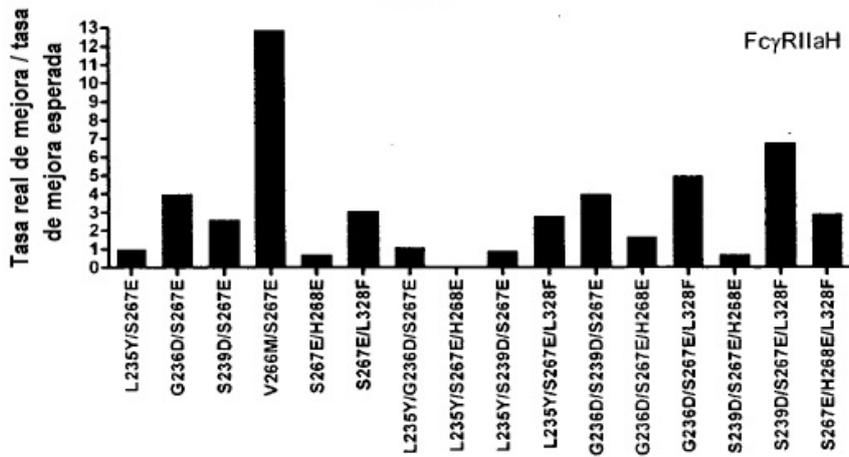


Figura 11E

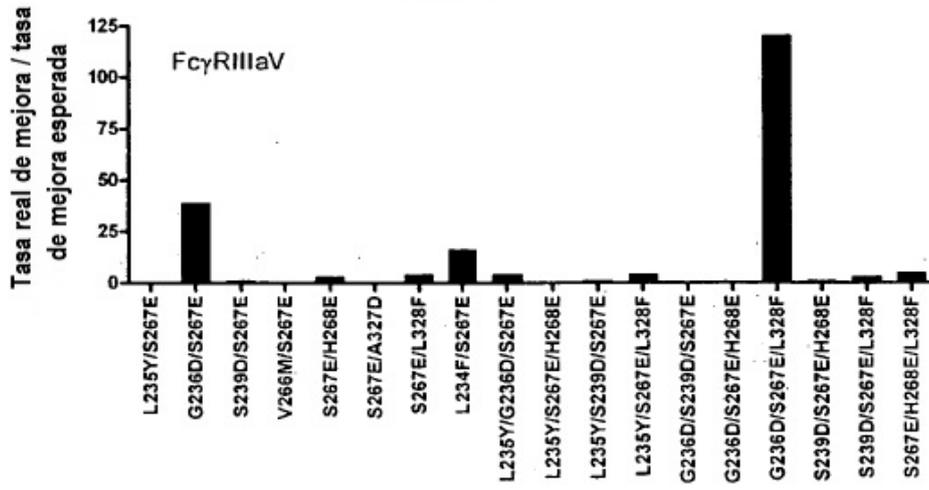
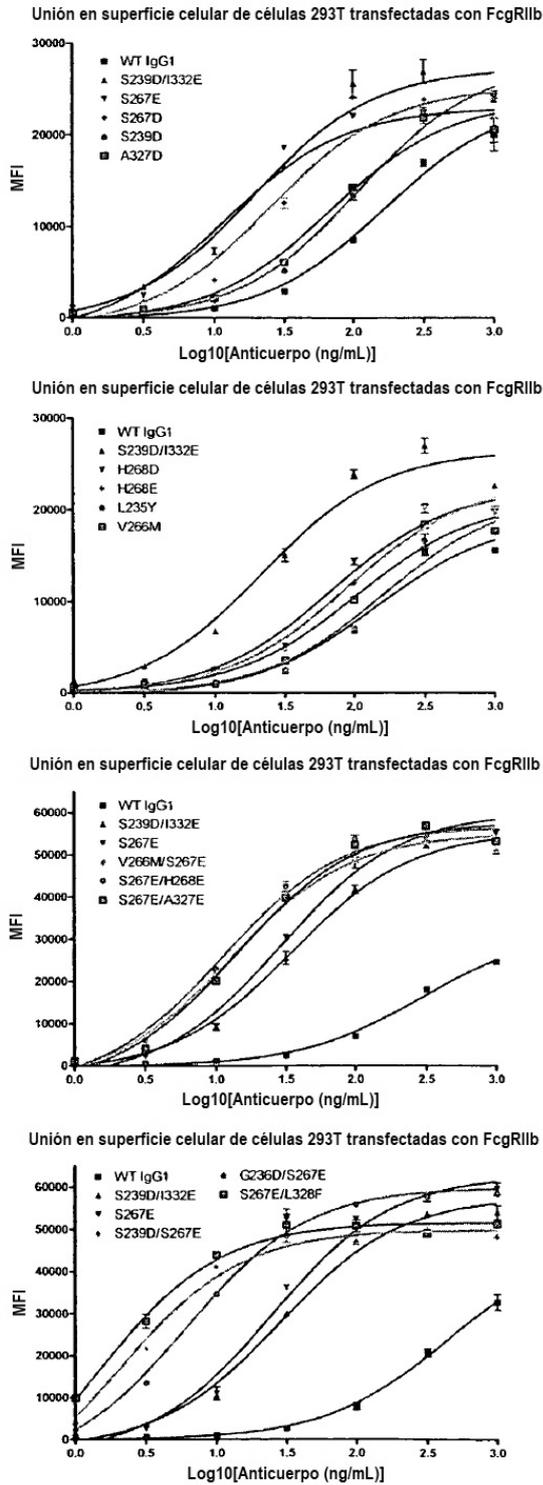
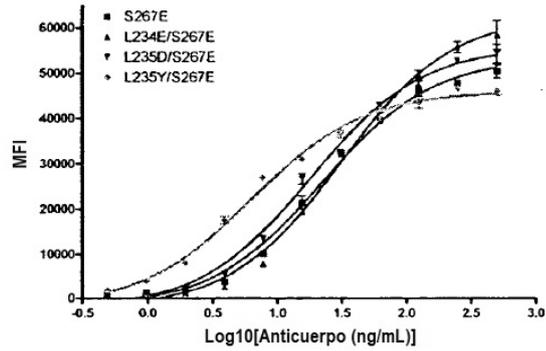


Figura 12



Unión en superficie celular de células 293T transfectadas con FcγRIIb



Unión en superficie celular de células 293T transfectadas con FcγRIIb

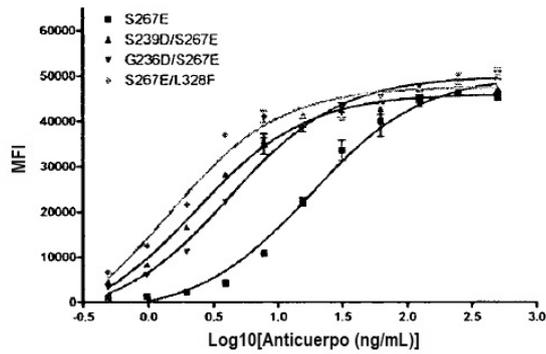


Figura 13

Sustitución(es)	Método	mFcγRIIb Tasa	mFcγRIV Tasa	cynoFcγRIIb Tasa	cynoFcγRIIIa Tasa
L234D/G236N/S267E	Kd	NB		NB	
L234D/S267E	off-	1.041	NB		
L234D/S267E	off-			0.495	0.116
L234F	off-	NB	0.144		
L234F	off-			0.936	0.561
L234G	off-	NB	NB		
L234G	off-			NB	0.113
L234K	off-	NB	NB		
L234K	off-			NB	NB
L234N	off-	NB	0.200		
L234N	off-			NB	0.371
L234Q	off-	NB	NB		
L234Q	off-			NB	0.379
L234W	Kd			1.896	
L234W/G236D/S239E/S267E	Kd	0.029		NB	
L234W/H268D/L328Y	Kd	5.923		4.629	
L234W/L328Y/I332E	Kd	0.617		2.038	
L234W/S239D/L328Y	Kd	44.110		5.922	
L234W/S239E/S267E	Kd	0.761		2.246	
L234Y	Kd			1.013	
L235A	off-	NB	0.496		
L235A	off-			NB	0.530
L235D/S239D	off-		1.571		1.407
L235E	off-	NB	0.857		
L235E	off-			NB	0.367
L235F/H268D/L328Y	Kd	6.822		3.169	
L235F/L328Y/I332E	Kd	0.843		4.109	
L235F/S239D/L328Y	Kd	31.204		5.196	
L235F/S267E	off-	NB	0.515		
L235F/S267E	off-			1.392	0.255
L235H	Kd			0.832	
L235N	off-	NB	0.241		
L235N	off-			NB	0.351
L235R	off-	NB	0.347		
L235R	off-			NB	NB
L235W	Kd			1.443	
L235Y	off-	1.022	0.507		
L235Y	off-			0.920	0.535
G236A/G237A	Kd	NB		NB	
G236D	off-	NB	NB		
G236D	off-			NB	NB
G236D/S267E	off-	NB	NB		
G236D/S267E	off-			NB	NB
G236E/S267E	off-	NB	NB		
G236E/S267E	off-			NB	0.327
G236F	off-	NB	NB		
G236F	off-			NB	0.138
G236N/S267E	off-	NB	NB		
G236N/S267E	off-			0.587	NB
G236P	off-	NB	NB		
G236P	off-			NB	NB
G236R	off-	NB	NB		
G236R	off-			NB	NB
G236S	Kd			3.549	1.453

ES 2 659 517 T3

G236S/G237A	Kd	NB		NB	
G236V	off-	NB	NB		
G236V	off-			0.703	NB
G237A	off-	NB	NB		
G237A	off-			NB	NB
G237E	off-	NB	NB		
G237E	off-			NB	NB
G237H	off-	NB	NB		
G237H	off-			NB	NB
G237K	off-	NB	NB		
G237K	off-			NB	NB
G237S	off-	NB	NB		
G237S	off-			NB	NB
S239D	Kd	2.006	2.525	1.638	7.579
S239D	off-	2.912	1.907		
S239D	off-			1.986	2.325
S239D/A327D/L328Y	Kd	45.296		1.309	
S239D/H268D	Kd	1.857	1.063	5.683	8.675
S239D/H268D	Kd	1.518		16.693	
S239D/H268D	off-		2.209		3.618
S239D/H268D/L328F	Kd	6.007		3.169	
S239D/H268D/L328F/I332E	Kd	2.592		27.604	
S239D/H268D/L328W	Kd	47.801		23.740	
S239D/H268D/L328W/I332E	Kd	4.814		4.549	
S239D/H268D/L328Y	Kd	48.629		22.246	
S239D/H268D/L328Y/I332E	Kd	3.036		9.099	
S239D/H268E/L328Y	Kd	26.535		5.873	
S239D/I332E	Kd	5.442	7.473	10.196	11.520
S239D/I332E	Kd	1.150		17.815	
S239D/K326D/L328Y	Kd	131.128		10.192	
S239D/L328F/I332E	Kd	2.093		3.086	
S239D/L328Y	Kd	11.463		2.135	
S239D/L328Y/I332E	Kd	1.702		5.121	
S239D/S267A/L328Y	Kd	46.483		6.463	
S239D/S267D	Kd	1.983	1.005	1.793	7.660
S239D/S267D	off-		1.875		2.734
S239D/S267E	Kd	1.746	0.726	1.588	3.881
S239D/S267E	off-	7.871	1.545		
S239D/S267E	off-			2.526	1.677
S239D/S267E/I332E	Kd	1.003		10.047	
S239D/S267E/L328F	Kd			4.581	1.171
S239E	off-	3.105	1.925		
S239E	off-			1.249	2.261
S239N	off-	0.610	1.074		
S239N	off-			0.660	1.146
S239Q	off-	1.740	0.711		
S239Q	off-			0.401	0.622
D265E	off-	0.833	0.526		
D265E	off-			0.648	0.636
V266D	off-	NB	NB		
V266D	off-			NB	NB
V266I	off-	1.416	1.193		
V266I	off-			0.826	0.979
V266M	off-	2.036	1.229		
V266M	off-			NB	0.433
S267A	off-	3.022	1.534		
S267A	off-			1.048	1.274
S267A/H268D/L328Y	Kd	32.404		3.262	
S267A/L328Y/I332E	Kd	2.633		3.655	
S267D	off-	1.945	1.267		
S267D	off-			1.031	1.271
S267D/A327D	off-	0.000		0.000	
S267D/H268D	Kd	0.902	0.598	1.860	5.333
S267D/H268D	off-	0.968		1.956	

ES 2 659 517 T3

S267E	off-	1.437	0.770		
S267E	off-			1.093	0.515
S267E/A327D	off-	0.971		0.697	
S267E/A327E	off-	2.796	1.036		
S267E/A327E	off-			1.033	0.465
S267E/H268E/L328F	Kd			3.514	1.043
S267E/L328F	Kd	1.060	0.020	0.881	NB
S267E/L328F	off-	4.887	0.198		
S267E/L328F	off-			1.263	NB
S267E/L328H	off-	1.111	NB		
S267E/L328H	off-			0.420	NB
S267E/L328I	off-	2.105	0.588		
S267E/L328I	off-			0.831	0.437
S267E/L328Q	off-	0.881	0.454		
S267E/L328Q	off-			0.367	0.124
S267E/L328Y	Kd	1.513	0.026	1.313	NB
S267E/L328Y	Kd	1.037		0.404	
S267E/L328Y	off-	7.915	NB		
S267E/L328Y	off-			1.934	NB
S267E/N325L	off-	NB	0.240		
S267E/N325L	off-			NB	NB
S267G	off-	NB	0.586		
S267G	off-			NB	0.343
H268D	Kd	1.111	0.470	1.475	4.235
H268D	off-	2.626	1.447		
H268D	off-			3.937	1.653
H268D/A327D	Kd	3.220	0.443	1.467	1.733
H268D/A327D	off-	5.095		1.797	
H268D/A327D/L328Y	Kd	18.722		3.581	
H268D/K326D/L328Y	Kd	19.368		9.381	
H268D/L328F/I332E	Kd	1.478		4.885	
H268D/L328W/I332E	Kd	4.260		7.465	
H268D/L328Y	Kd	2.785		2.924	
H268D/L328Y/I332E	Kd	1.281		4.085	
H268E	off-	2.443	1.417		
H268E	off-			2.230	1.509
H268E/L328Y/I332E	Kd	1.498		4.157	
H268N	off-	1.597	1.025		
H268N	off-			1.345	0.990
H268Q	off-	0.877	1.085		
H268Q	off-			0.864	0.983
S298D	off-	NB	0.618		
S298D	off-			NB	0.309
S298E	off-	NB	0.136		
S298E	off-			NB	0.046
S298L	Kd	0.208		0.040	
S298M	Kd	0.549		2.846	
S298Q	off-	1.412	0.291		
S298Q	off-			0.714	0.271
K326A	Kd	0.164		1.359	
K326D/L328Y/I332E	Kd	1.872		4.775	
K326E	Kd	0.605		1.029	
K326W	Kd	0.429		0.078	
A327D	Kd	1.857	0.315	1.156	0.783
A327D	off-	4.102	0.876		
A327D	off-			1.147	0.515
A327D/L328Y/I332E	Kd	1.239		1.019	
A327G	off-	1.452	1.229		
A327G	off-			0.903	0.443
A327L	Kd	NB		NB	
A327N	off-	0.643	1.159		
A327N	off-			NB	0.313
A327Q	off-	NB	0.361		
A327Q	off-			NB	0.223

L328E	Kd	0.016		NB	
L328F	off-	3.122	0.261		
L328F	off-			0.380	0.144
L328Y/I332E	Kd	0.434		4.599	
P329E	off-	NB	NB		
P329E	off-			NB	NB
A330D	Kd	2.633		NB	
A330H	Kd	0.013		NB	
A330K	Kd	0.296		2.019	
A330S	Kd	0.054		0.255	
P331S	Kd	0.085		0.250	

Figura 14

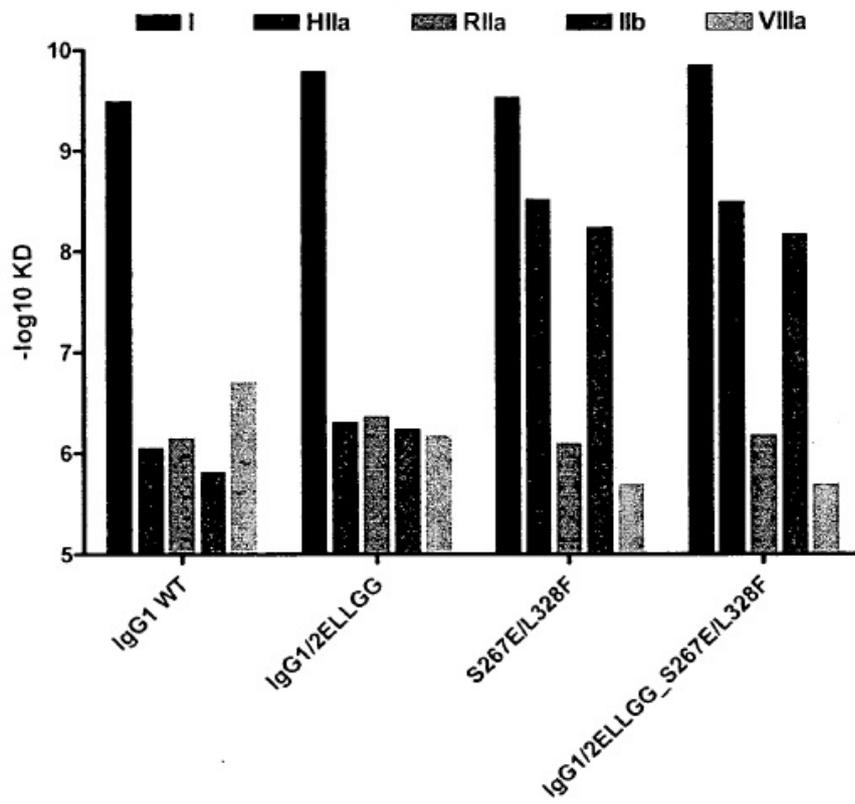


Figura 15A

Proliferación de células B purificadas a concentraciones variables de anti-mu a los 3 días

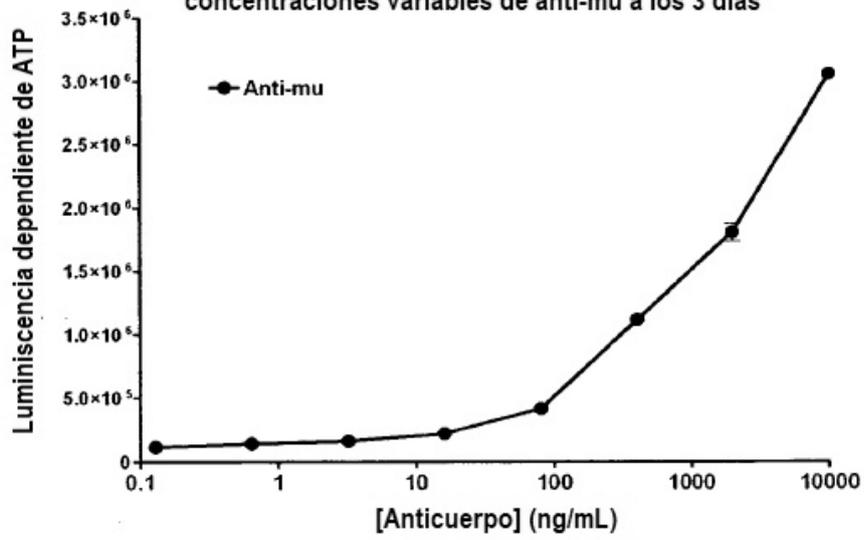


Figura 15B

Proliferación de células B purificadas a concentraciones variables de anti-CD79b a los 3 días

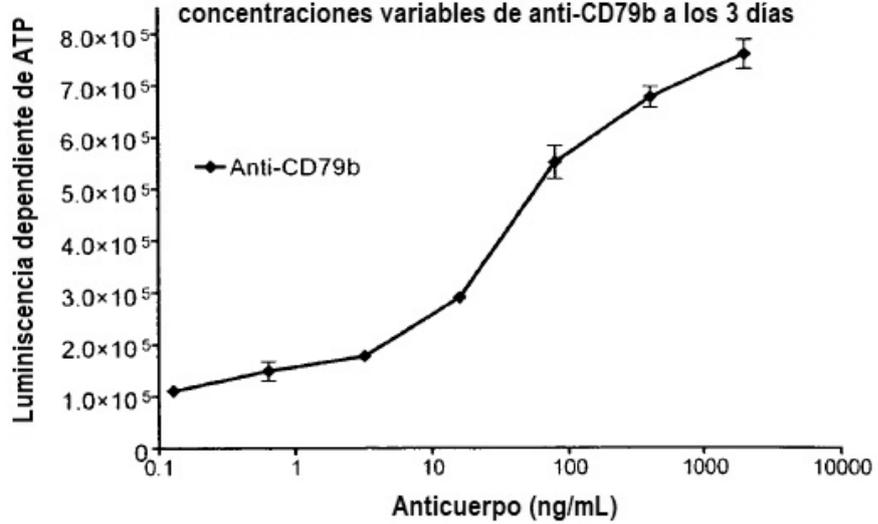


Figura 16

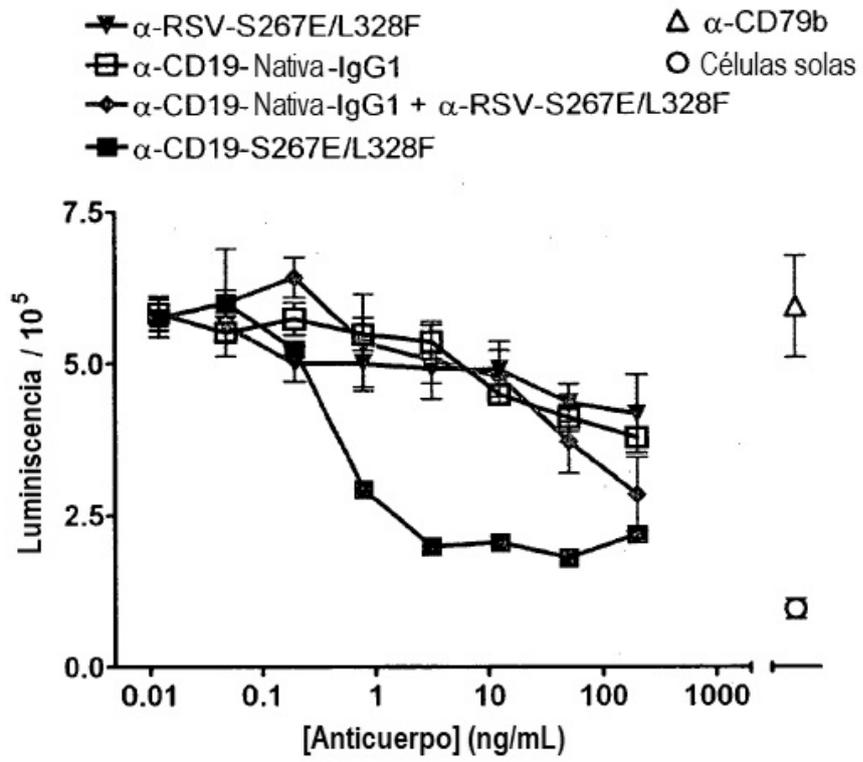


Figura 17

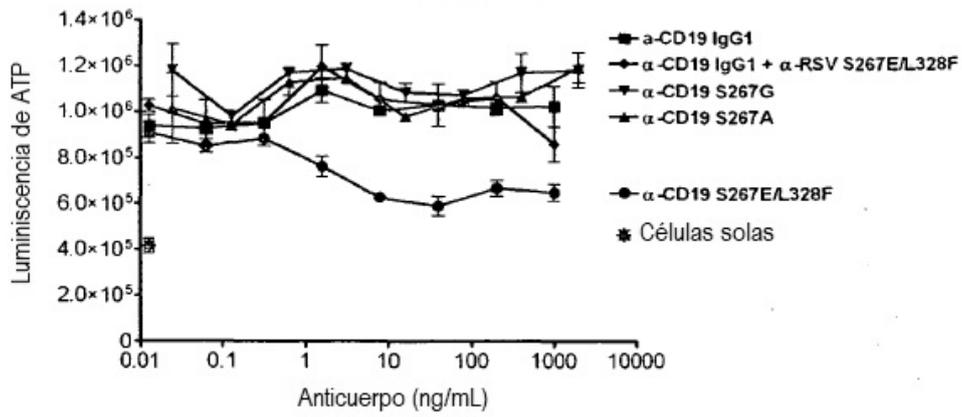


Figura 18

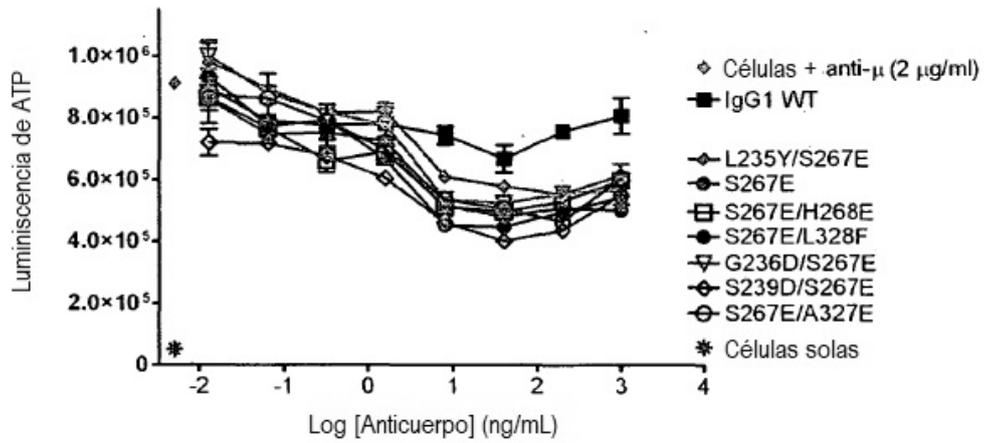


Figura 19

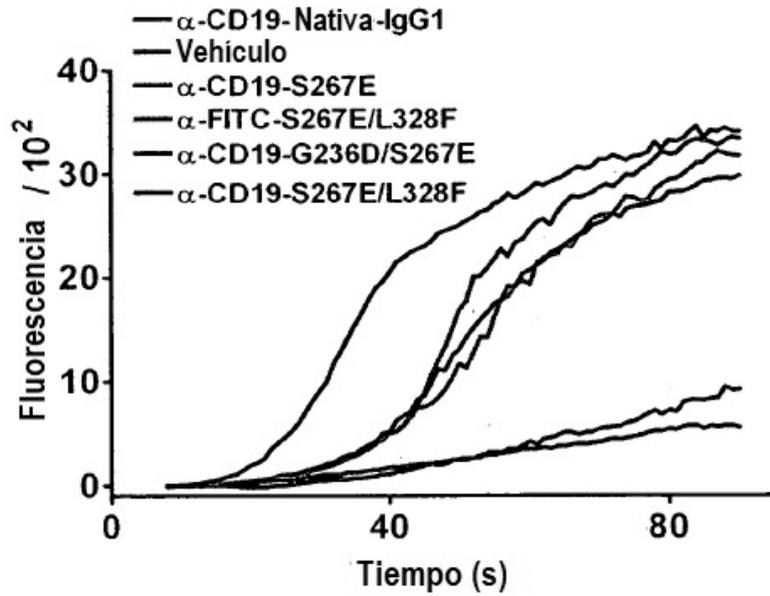


Figura 20

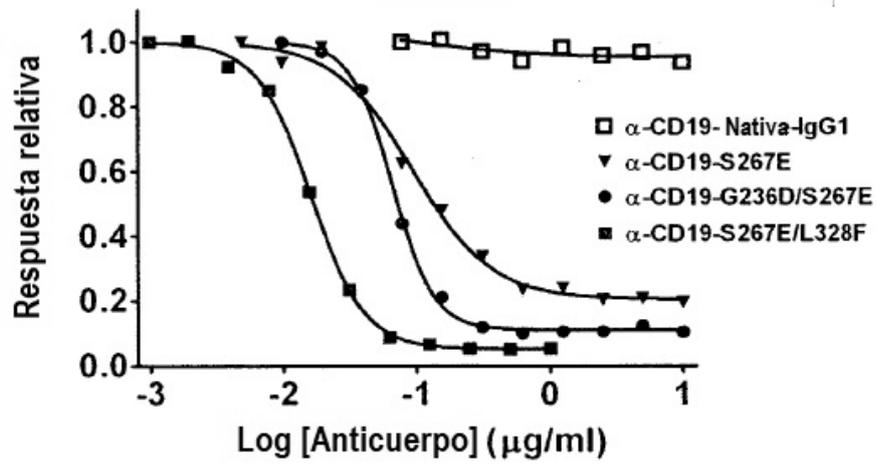


Figura 21

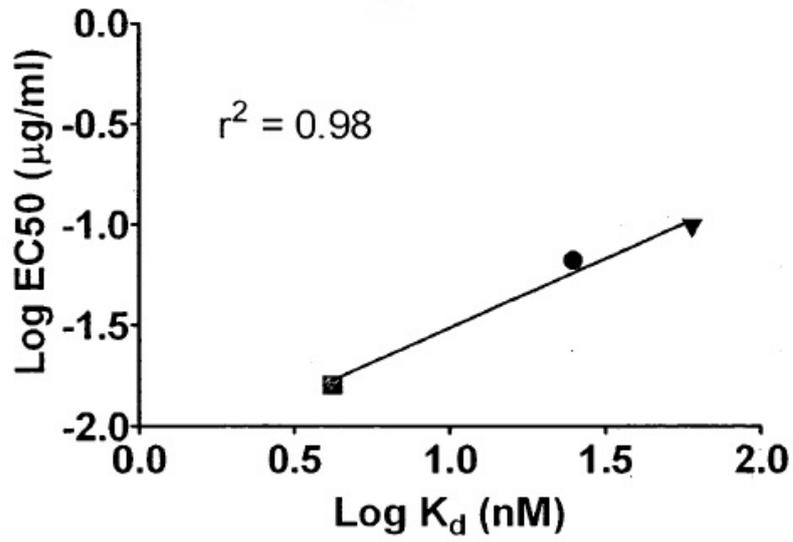


Figura 22

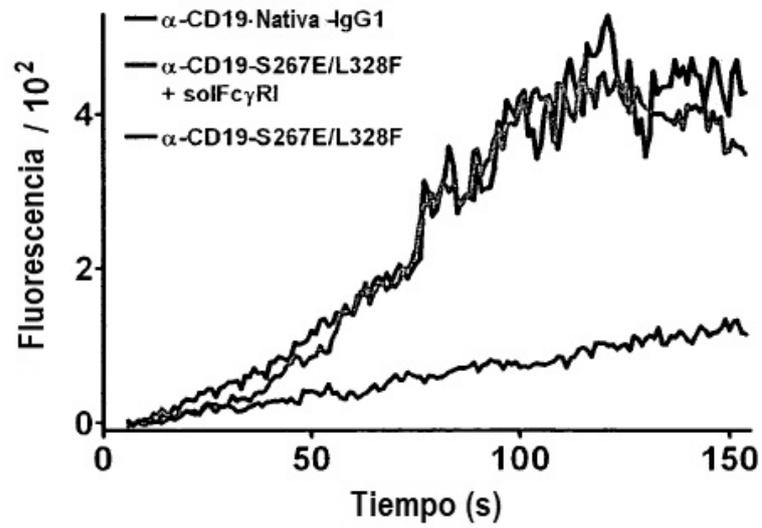


Figura 23

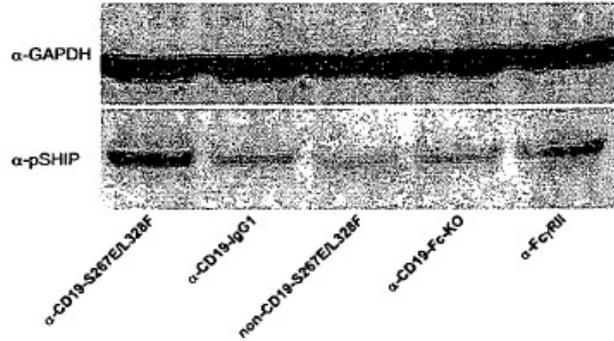


Figura 24

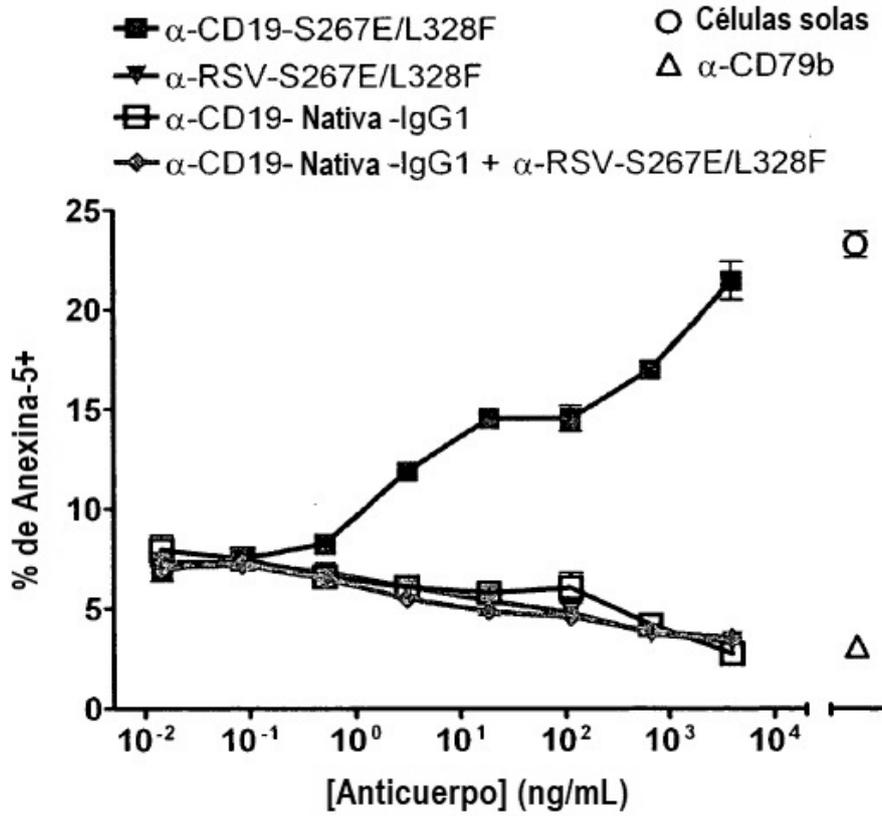


Figura 25

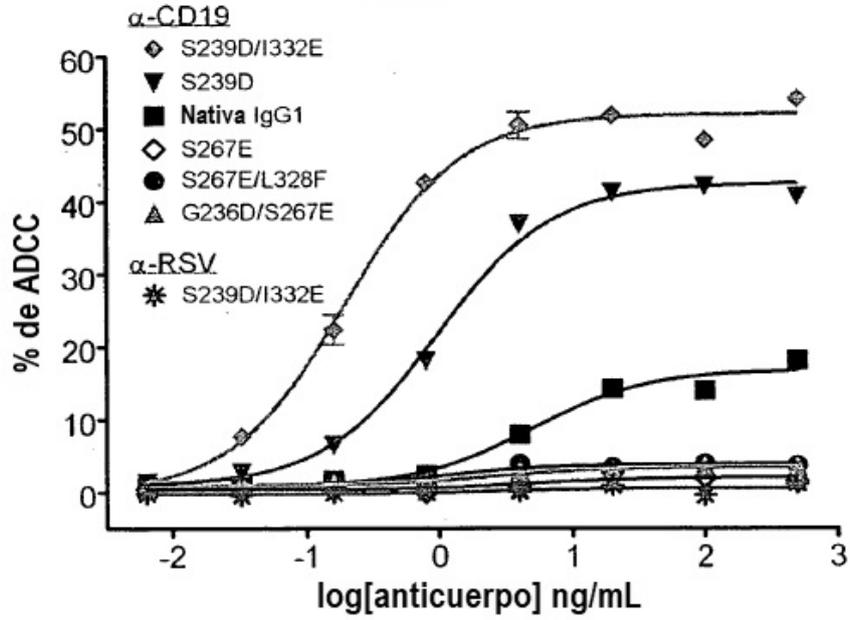


Figura 26

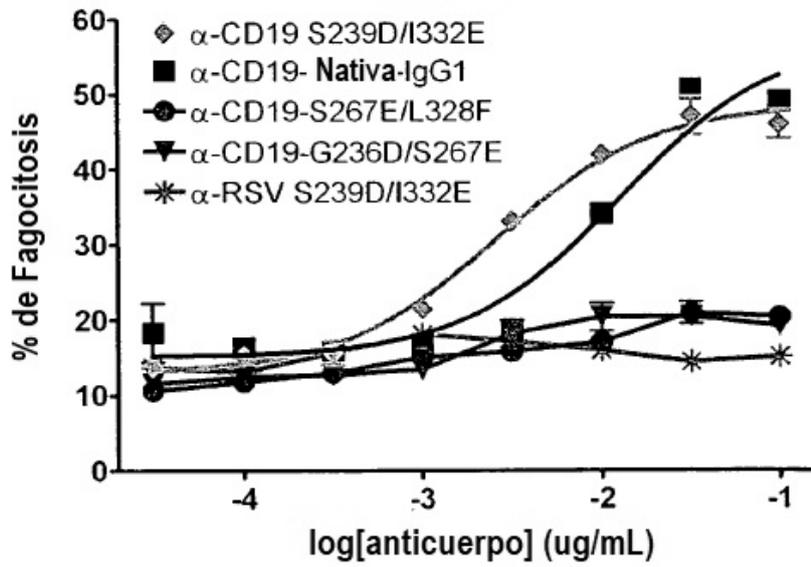


Figura 27

CDC 40k células/pocillo

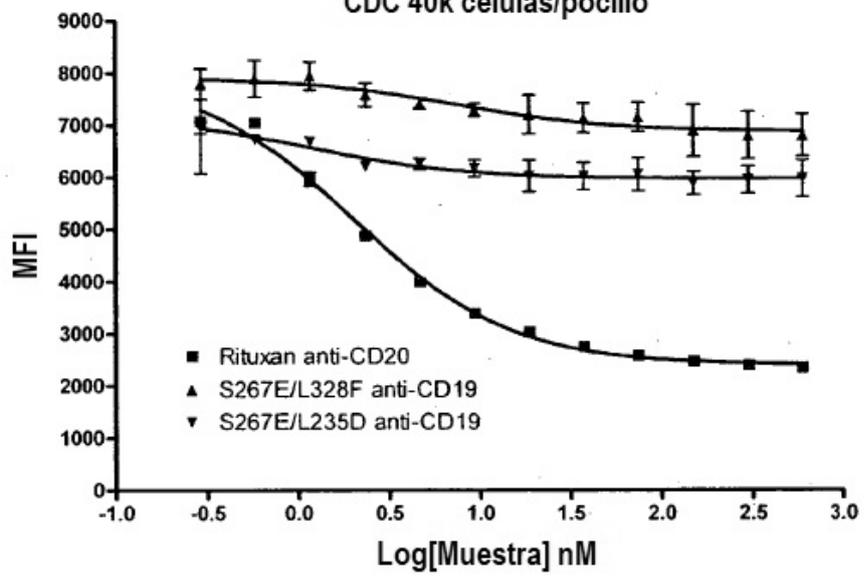


Figura 28A

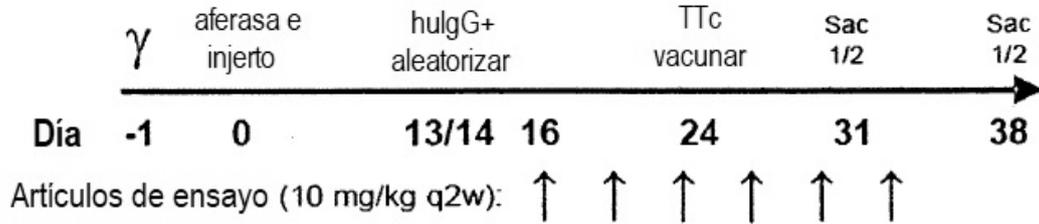


Figura 28B

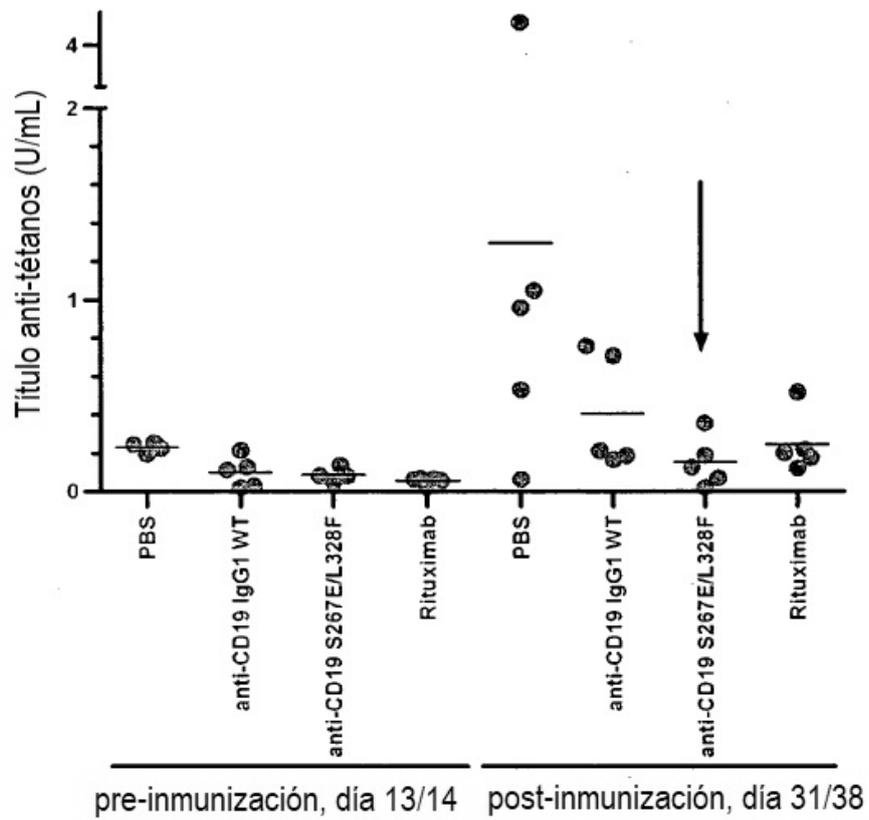


Figura 29

Antígeno	Expresión	Función
CD19	B, DC	Co-receptor de BCR
CD20	B	Regulador Ca <sup>++</sup> membrana
CD21 (CR2)	B, DC	Co-receptor de BCR
CD22	B	Co-receptor de BCR, regulador negativo
CD23 / FcεRII	B, MΦ, Eos, DC	Receptor de IgE
FcεRI (subunidades α, β y γ)	Mast, Baso	Receptor de IgE
CD24 / BBA-1 / HSA	B	Adhesión celular y movilidad
CD27	células B memoria	Interfaz de célula T
CD35 (CR1)	B	Receptor de complemento
CD38	B, plasma	Adhesión celular
CD40	B, DC	Interfaz de célula T, co-estimulador de célula T
CD45RA	B	Fosfatasa de membrana
CD52 / CAMPATH -1 / HE5	B	Señalización celular
CD72	B	Modulador de señalización de BCR
CD79a (Igα)	B, DC	Componente de señalización de BCR
CD79b (Igβ)	B, DC	Componente de señalización de BCR
IgM (μ)	B	Componente de reconocimiento de antígeno de BCR
CD80	B, DC	Interfaz de célula T
CD81	B	Co-receptor de BCR
CD86	B, DC	Interfaz de célula T
Leu13	B	Co-receptor de BCR
HLA-DR, -DP, -DQ	B, MΦ, DC	Interfaz de célula T
CD138	Plasma	Co-receptor de factor de adhesión y crecimiento celular
CD317 / HM1.24	Plasma	Antígeno de célula estromal de médula ósea (BST2)
CD11a	MΦ	integrina alfa L
CD11b	MΦ	integrina alfa M
CD11c	MΦ	integrina alfa X
CD14	MΦ, PMN	Receptor de LPS
CD68	MΦ	KP1, macrosialina
CD163	MΦ	Receptor de recuperador de hemoglobina/haptoglobina
CD172a	MΦ	SIRP-alfa
CD200R	MΦ	Receptor de OX2
CD206	MΦ	Receptor de manosa MΦ

Figura 30

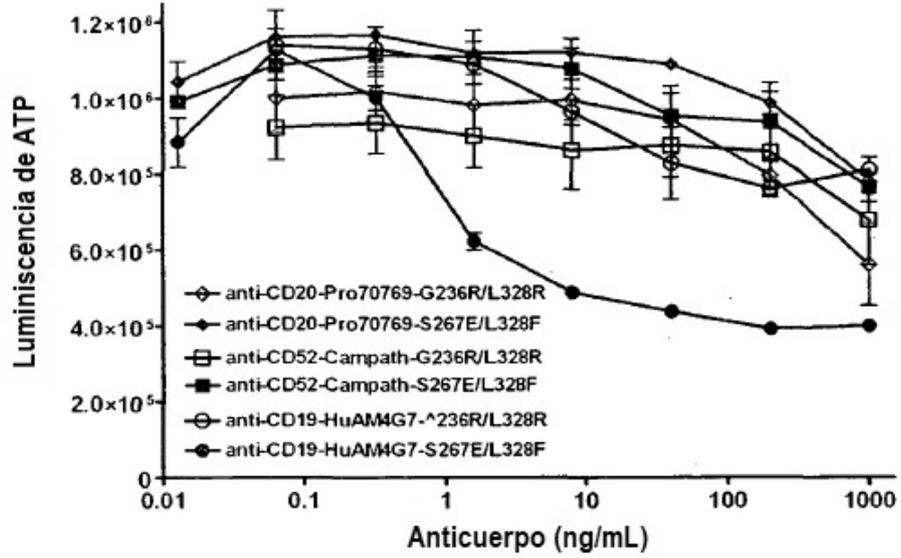


Figura 31

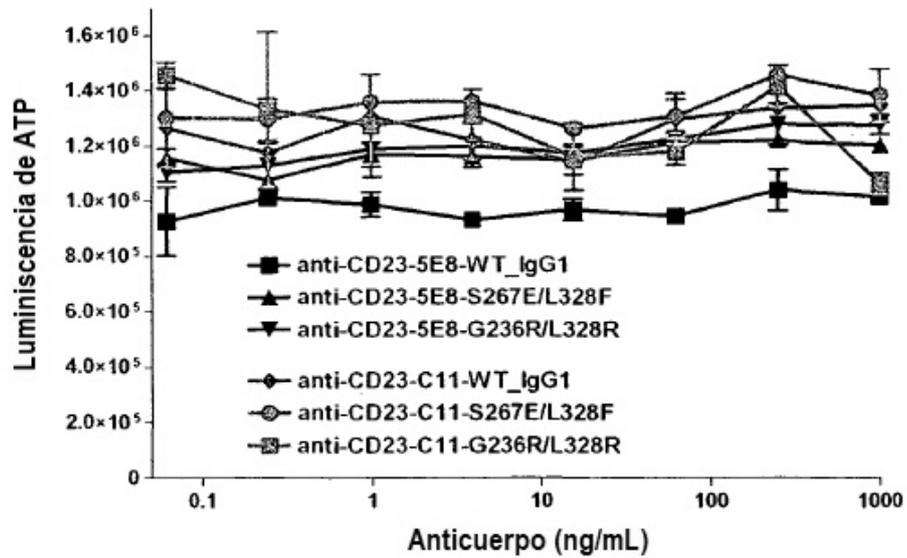


Figura 32

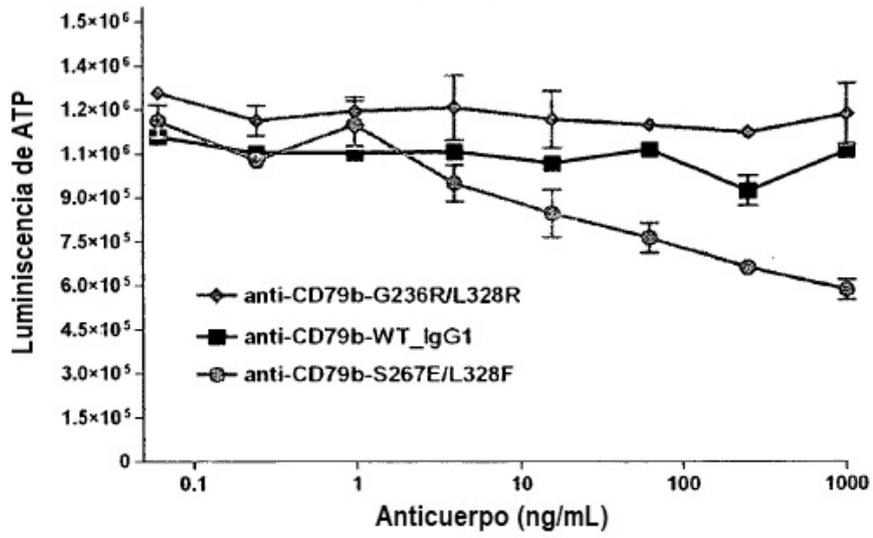
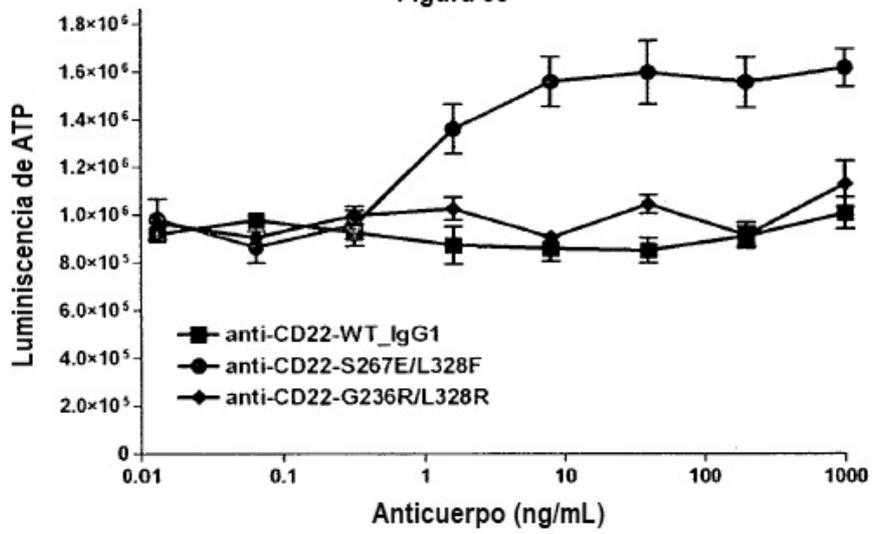


Figura 33



f

Figura 34A

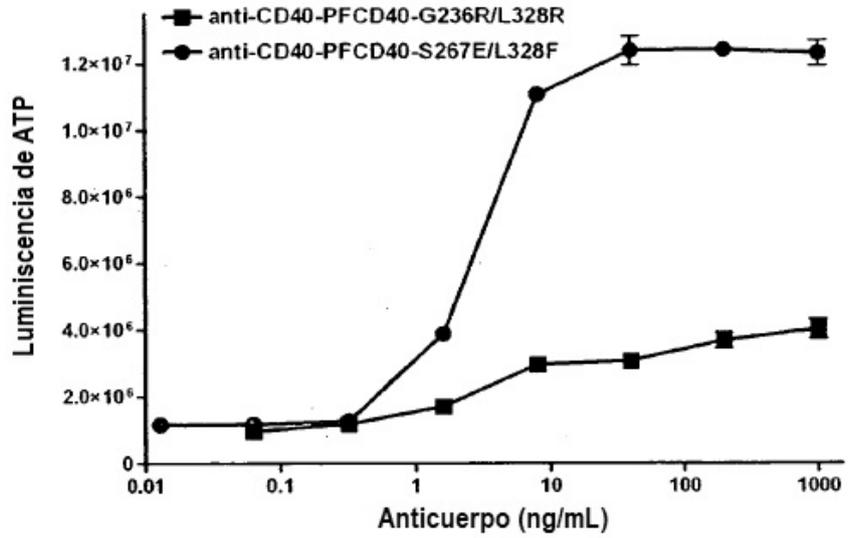
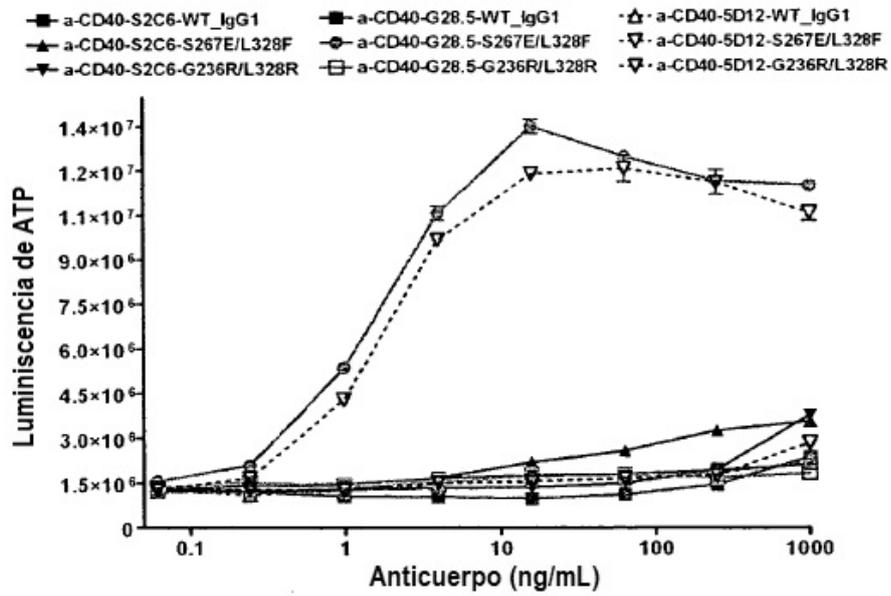


Figura 34B



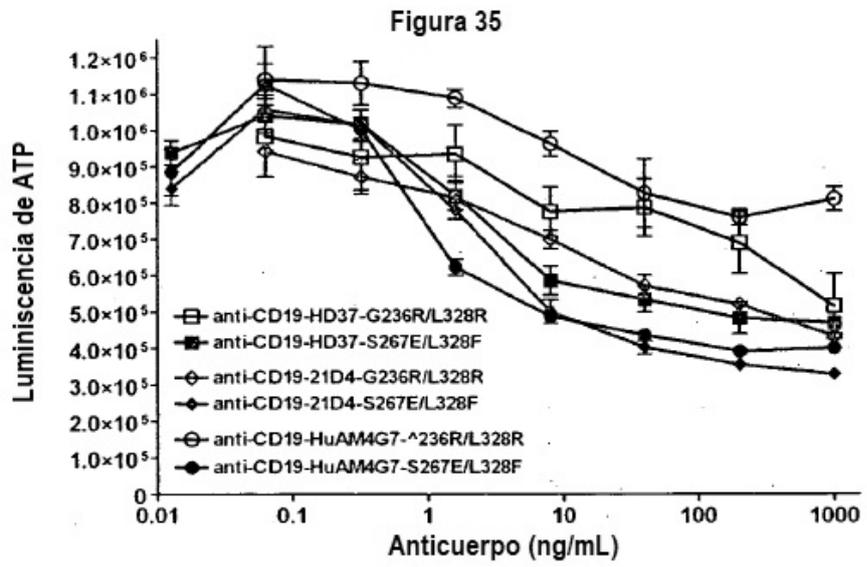


Figura 36A

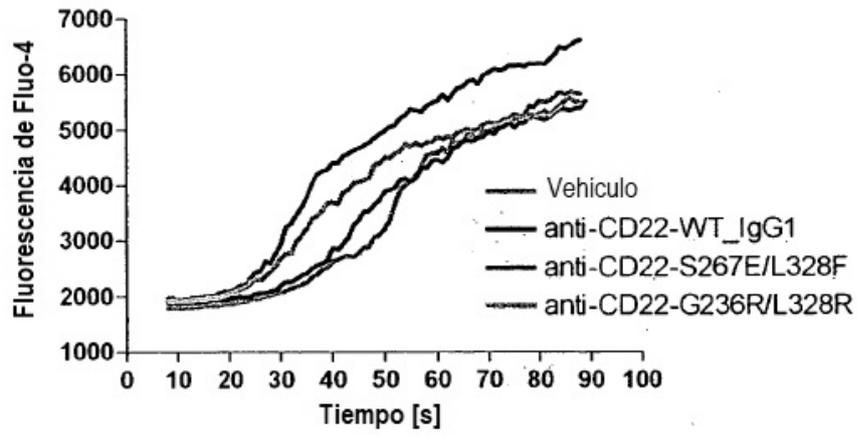


Figura 36B

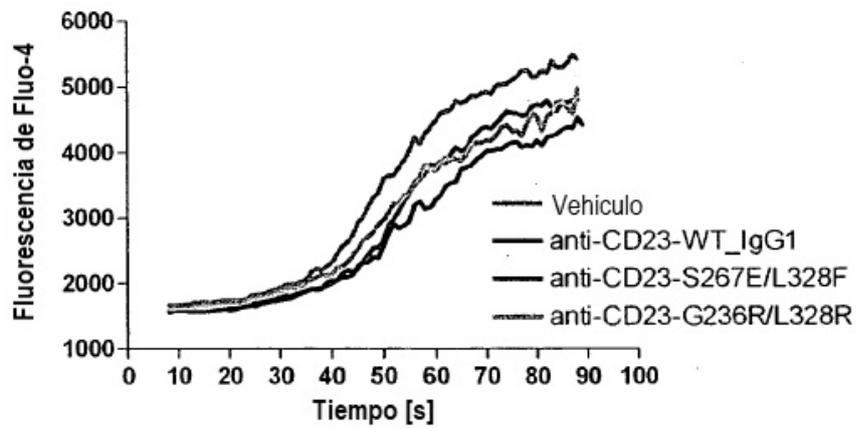


Figura 36C

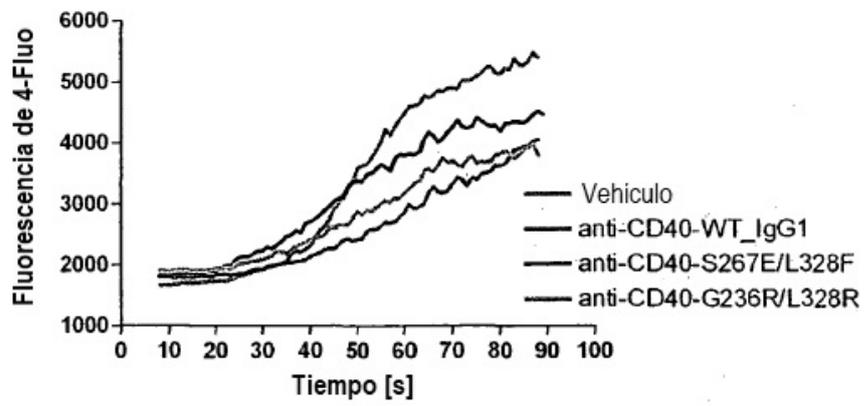


Figura 36D

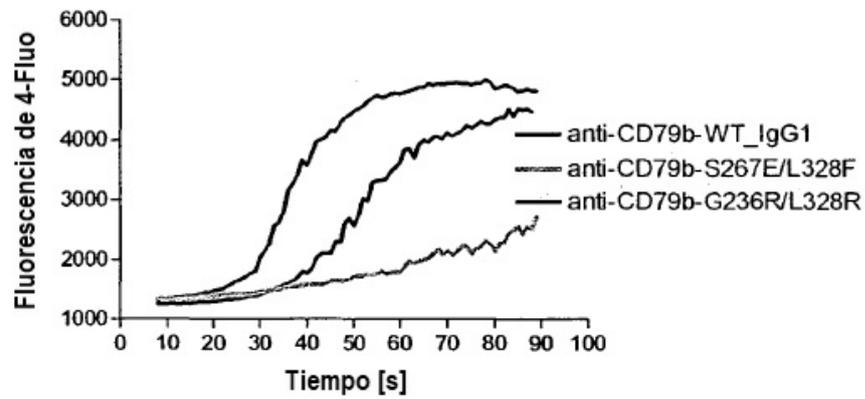


Figura 37

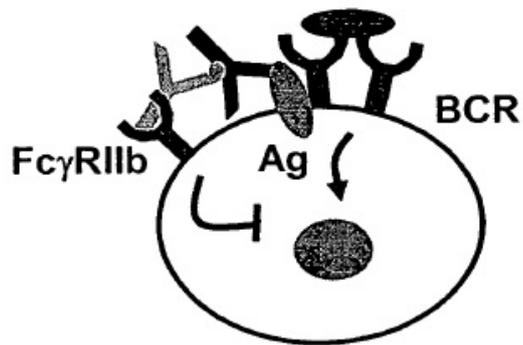


Figura 38

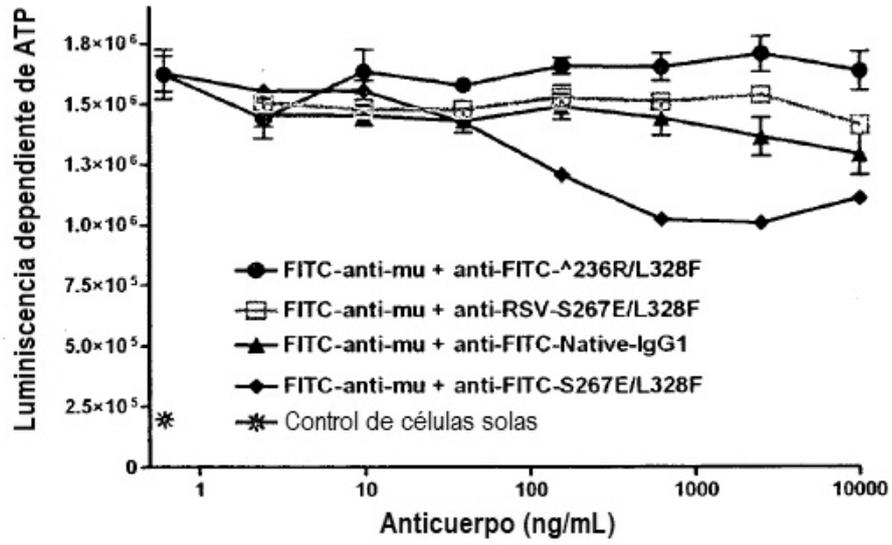
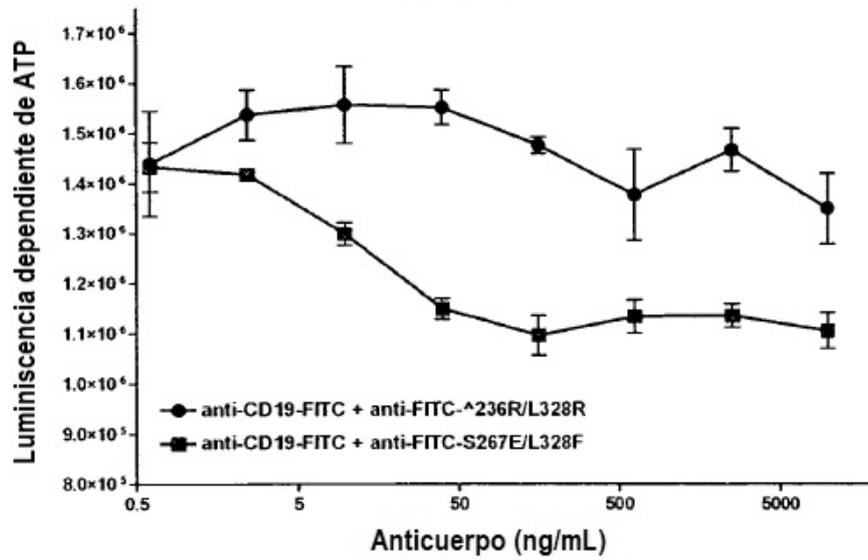


Figura 39



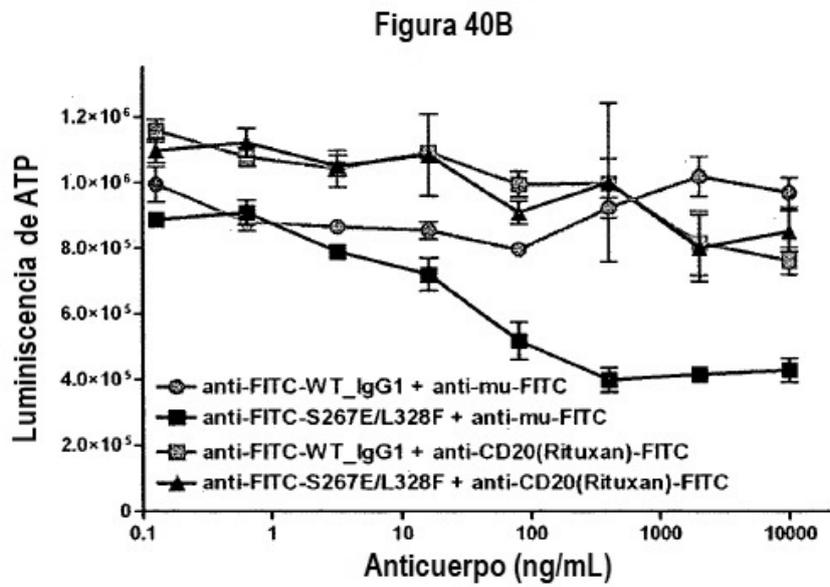
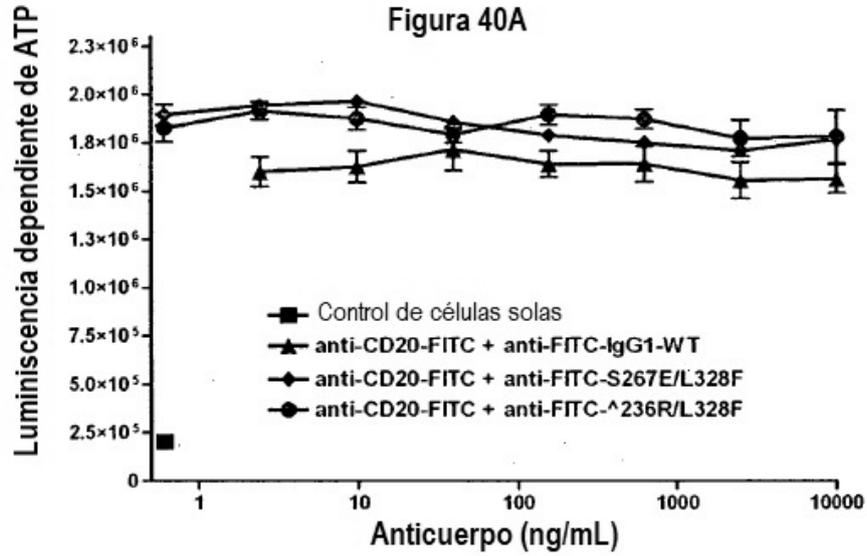


Figura 41

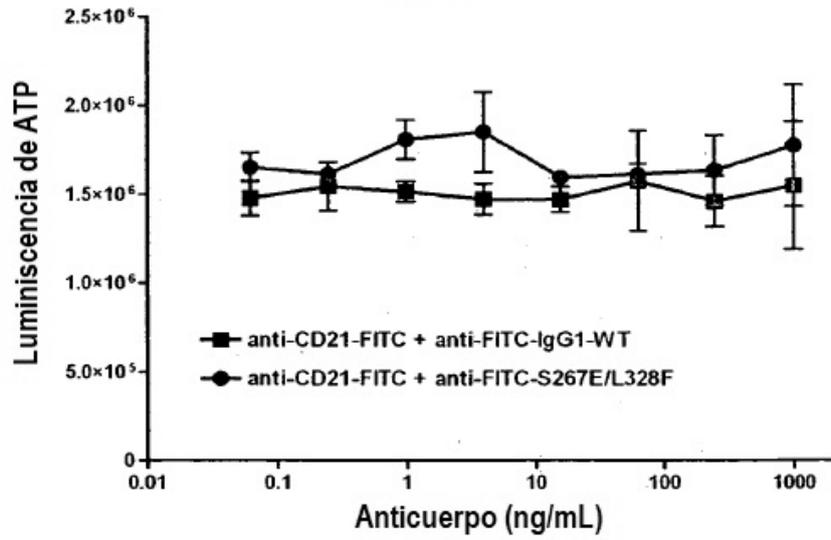


Figura 42

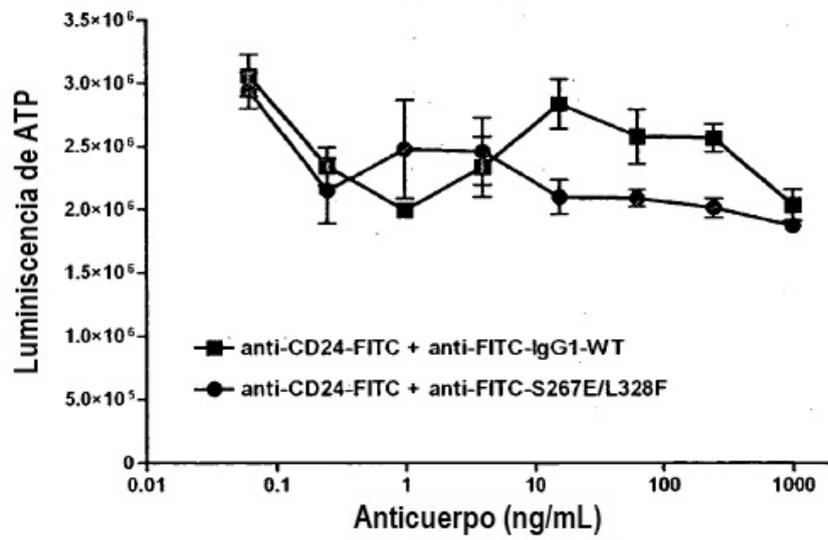


Figura 43

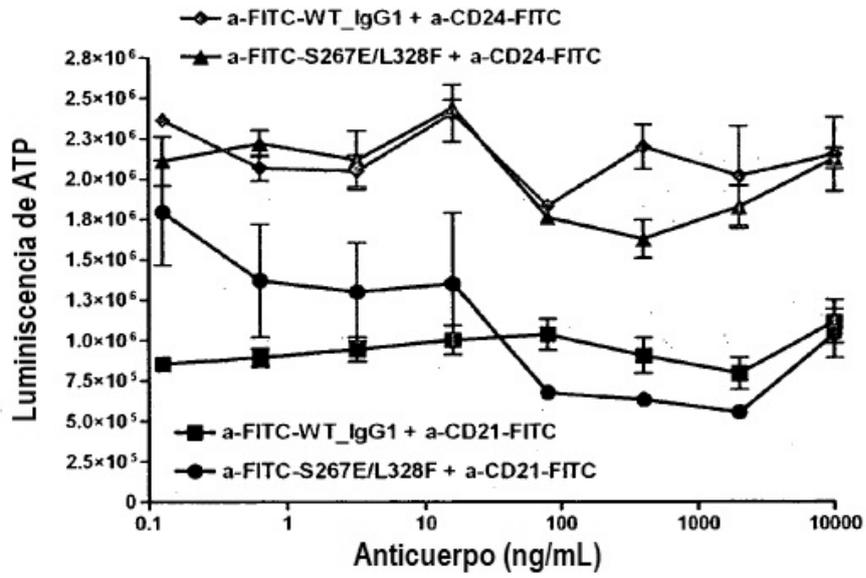


Figura 44

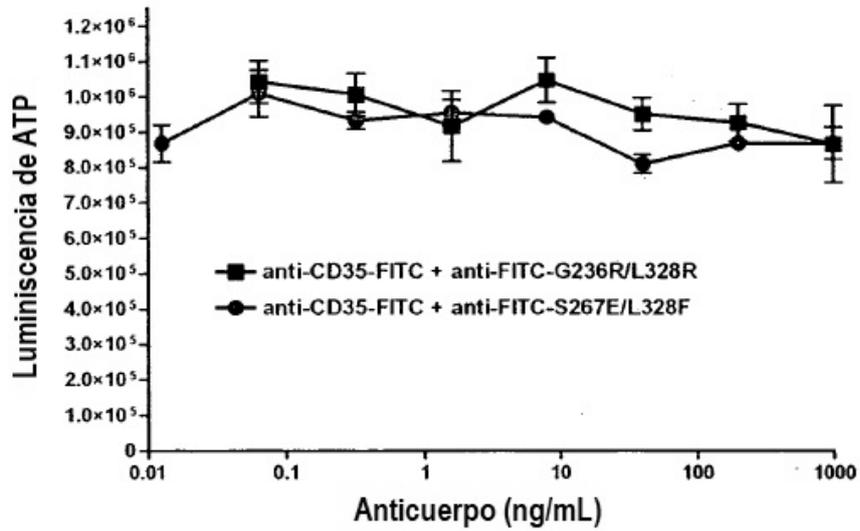


Figura 45

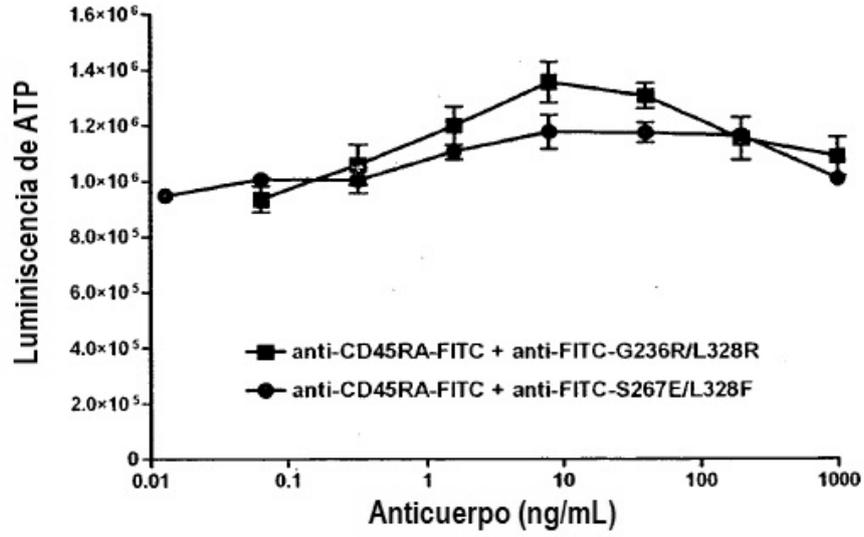


Figura 46

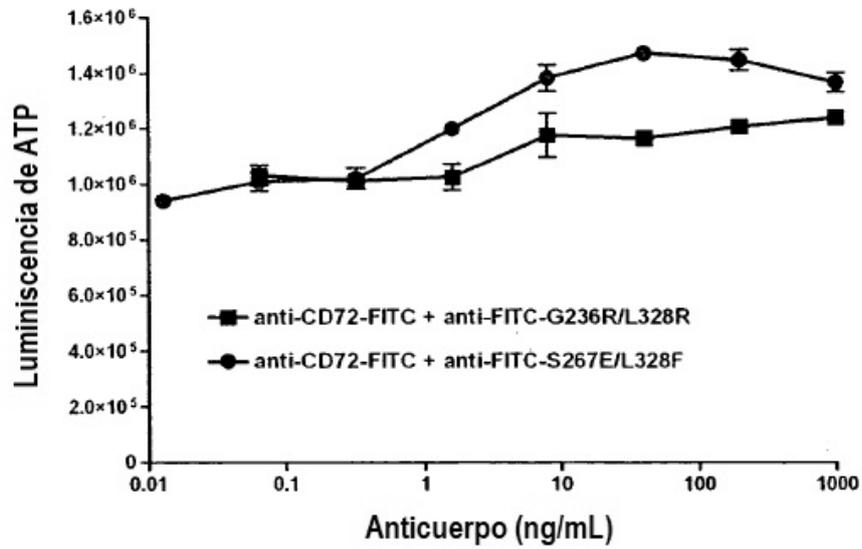


Figura 47

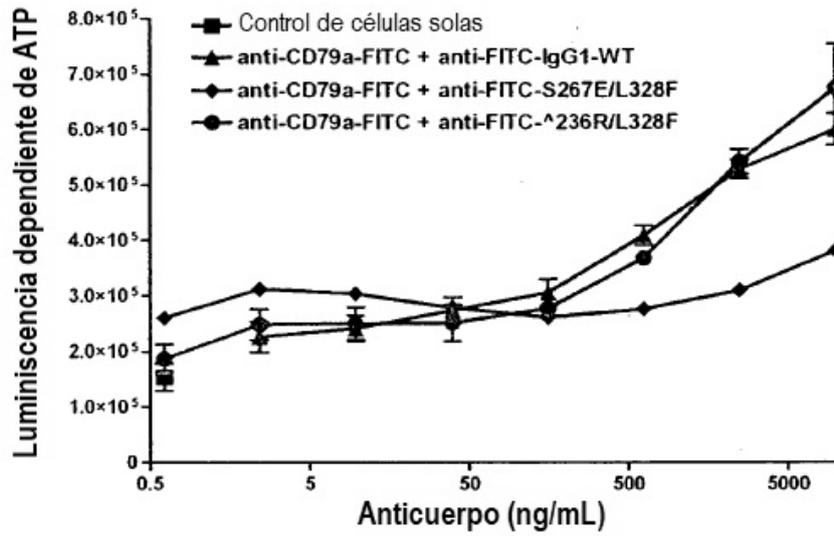


Figura 48

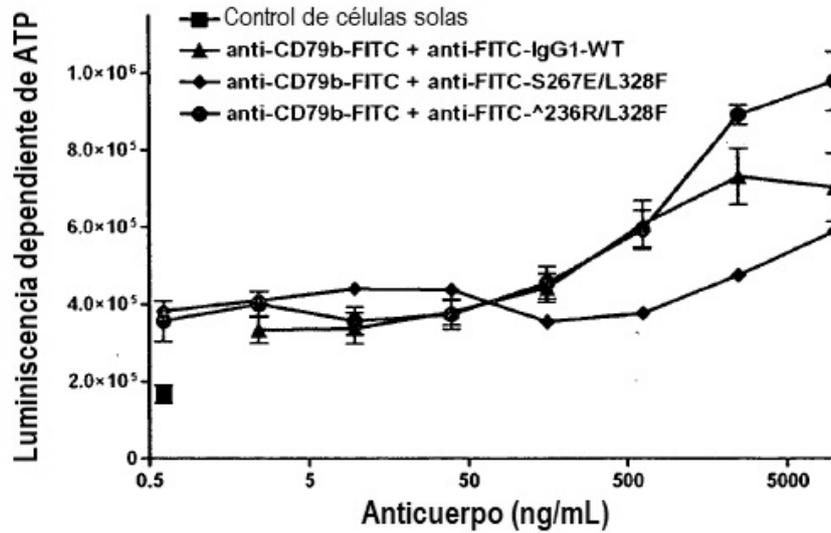


Figura 49

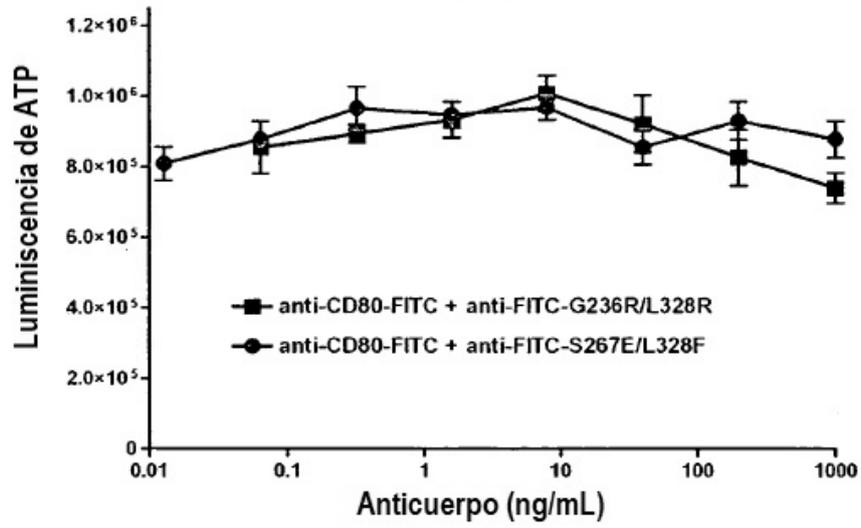


Figura 50

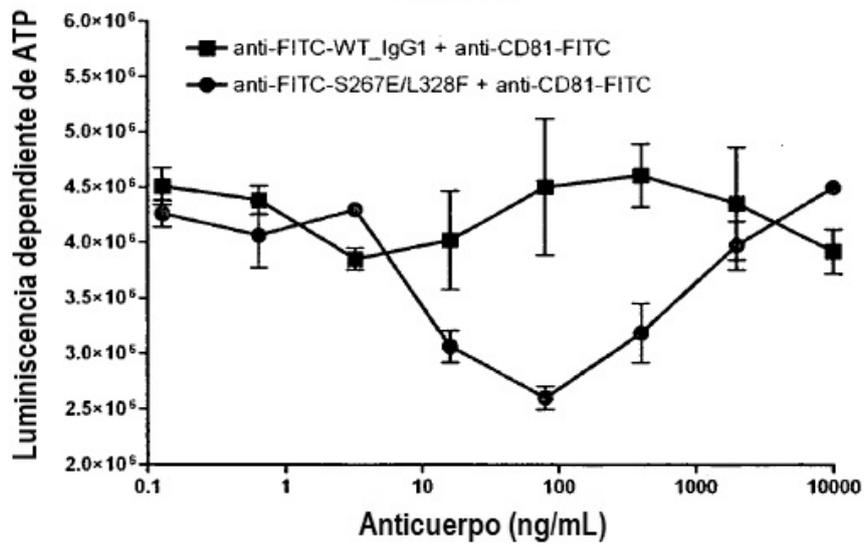


Figura 51

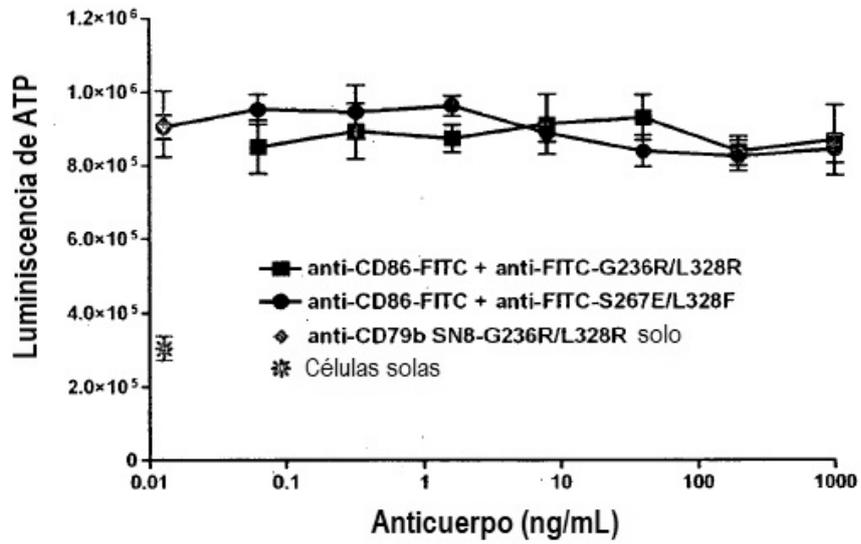


Figura 52

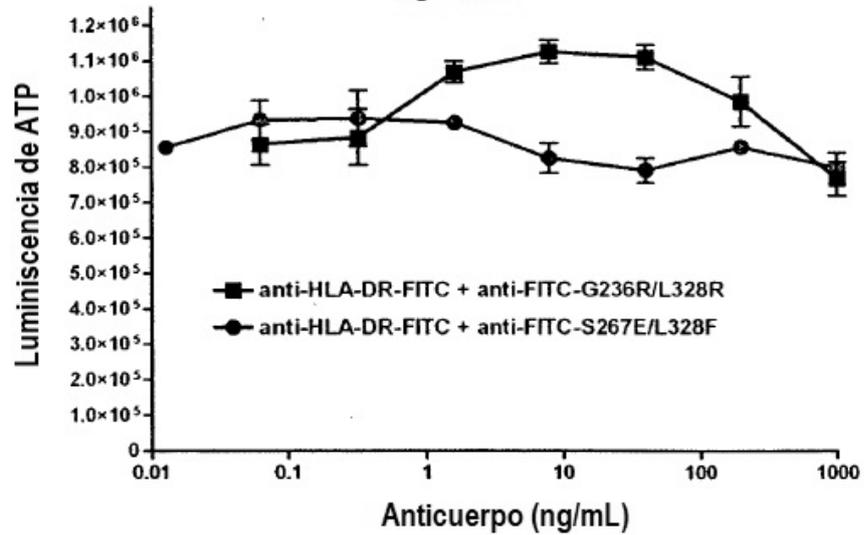


Figura 53

Antígeno	Estrategia	Viabilidad de células B	Liberación de calcio
$\mu$	Hapteno	Inhibidor	ND
CD19	Variante de Fc	Inhibidor	Inhibidor
	Hapteno	Inhibidor	ND
CD20	Variante de Fc	No activo	ND
	Hapteno	No activo	ND
CD21	Hapteno	No activo	ND
CD22	Variante de Fc	Estimulador	Estimulador
CD23	Variante de Fc	No activo	No activo
CD24	Hapteno	No activo	ND
CD35	Hapteno	No activo	ND
CD40	Variante de Fc	Estimulador	Estimulador
CD45RA	Hapteno	No activo	ND
CD72	Hapteno	Estimulador	ND
CD79a	Hapteno	Inhibidor	ND
CD79b	Variante de Fc	Inhibidor	Inhibidor
	Hapteno	Inhibidor	ND
CD80	Hapteno	No activo	ND
CD81	Hapteno	Posiblemente inhibidor	ND
CD86	Hapteno	No activo	ND
HLA-DR	Hapteno	Posiblemente inhibidor	ND
ND = no determinado			

Figura 54

**HuAM4G7 VL (SEQ ID NO:1)**

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK

**HuAM4G7 VH (SEQ ID NO:2)**

EVQLVESGGGLVLPKGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY  
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQGLTVTVSS

**Cadena ligera Ckappa (SEQ ID NO:3)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Cadena constante de IgG1 nativa (SEQ ID NO:4)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Cadena constante de IgG1 S267E/L328F (SEQ ID NO:5)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Cadena constante de IgG1 G236D/S267E (SEQ ID NO:6)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Cadena ligera de HuAM4G7 (VH-Ck) (SEQ ID NO: 7)**

DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNLNS  
GVPDRFSGSGSGTEFTLTISSELEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL  
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Cadena pesada de IgG1 de HuAM4G7 (SEQ ID NO:8)**

EVQLVESGGGLVLPKGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY  
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQGLTVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Cadena pesada HuAM4G7 S267E/L328F (SEQ ID NO:9)**

EVQLVESGGGLVLPKGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTKY  
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQGLTVTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Cadena pesada de HuAM4G7 G236D/S267E (SEQ ID NO:10)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGTY  
NEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGGQTLTVSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**anti-RSV Numax VL (SEQ ID NO:11)**

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLSASGVPSRF  
SGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCFQSGSGYPFTFGGGTKVEIK

**anti-RSV Numax VH (SEQ ID NO:12)**

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGVWIRQPPGKALEWLADIWDDKKH  
YNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFNFYFDVWGQGTITVTVSS

**anti-FITC VL (SEQ ID NO:13)**

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNSGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIKVSNRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

**anti-FITC VH (SEQ ID NO:14)**

EVKLDDEGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSDYWMNWVRQSPKGLEWVAQIRNKPYNYE  
TYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTITVTVSS

**anti-CD79b SN8 VL (SEQ ID NO:15)**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVYDGDGDFLNWYQQKPGQPPKLFIIYAASNLESGI  
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELK

**anti-CD79b SN8 VH (SEQ ID NO:16)**

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEIFPGGGDTNY  
NEIFKGGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVVPVYFDYWGGQGTITVTVSS

**anti-CD20 Pro70769 VL (SEQ ID NO:17)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRF  
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQWWSFNPPFTFGGQTKVEIK

**anti-CD20 Pro70769 VH (SEQ ID NO:18)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIIYPGNGDTS  
YNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTITV  
VSS

**anti-CD52 Campath VL (SEQ ID NO:19)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIKYLWYQQKPGKAPKLLIYNTNQLTGVPSRF  
SGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQWWSFNPPFTFGGQTKVEIK

**anti-CD52 Campath VH (SEQ ID NO:20)**

QVQLQESGPGGLVLRPSQTLSTCTVSGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTT  
EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGGSLTVTS  
S

**anti-CD23 5E8 VL (SEQ ID NO:21)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRYYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRF  
SGSGSGTEFTLTVSSSLQPEDFATYYCQVYSTPRFTFGGQTKVEIK

anti-CD23 5E8 VH (SEQ ID NO:22)

EVQLVESGGGLAKPGGSLRLSCAASGFRFTFNNYYMDWVRQAPGGGLEWVSRISSSGDP  
TWYADSVKGRFTISRANNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCASLTTGSDSWGQGLVTVSS

anti-CD23 C11 VL (SEQ ID NO:23)

DIVITQDELSNPVTSGESVSI SCRSSKSLLYKDGKTYLNWFLQRPGQSPQLLMYLMSTRASG  
VSDRFSGSGSGTDFTLEISRKAEDVGVYYCQQLVEYPTFGSGTKLEIK

anti-CD23 C11 VH (SEQ ID NO:24)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAVSAGFTFSGYWMSWVRQSPKGLWVAEIRLKSADNYA  
THYAESVKGKFTISRDDSKSRLYLQMNSLRAEDSGVYYCTDFIDWGQGLVTVSS

anti-CD22 RFB4 VL (SEQ ID NO:25)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYTSILHSGVPSRFS  
GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIK

anti-CD22 RFB4 VH (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTTY  
PDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLSKSEDTAMYCARHSGYGSYGVLFAYWGQGLVTV  
TSA

anti-CD40 PFCD40 VL (SEQ ID NO:27)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA TLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQANIFPLTFGGGKVEIK

anti-CD40 PFCD40 VH (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGGGLEWMMGWINPDSGGT  
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWG  
QGLVTVSS

anti-CD40 S2C6 VL (SEQ ID NO:29)

DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSLVHNSGNTFLHWY LQKPGQSPKLLIYTVSNRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTHVPWTFGGGKLEIQ

anti-CD40 S2C6 VH (SEQ ID NO:30)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYIHWVKQSHGKSLEWIGRVPNNGGTSYN  
QKFKGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREGIYWWGHGTTLVSS

anti-CD40 G28.5 VL (SEQ ID NO:31)

DAVMTQNPLSLPVSLGDEASISCRSSQSLVNSGNTFLNWFQKPGQSPQLLIYRVSNRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGTTLEIK

anti-CD40 G28.5 VH (SEQ ID NO:32)

DIQLQQSGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITTNYNWNWIRQFPGNKLEWMMGYIRYDGTSEY  
PSLKNRVSITRDTSMNQFFLRLTSVTPEDTATYYCARLDYWGQGTSVTVSS

anti-CD40 5D12 VL (SEQ ID NO:33)

ELQLTQSPSLPVSLGDQASISCRSSQSLVNSGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

anti-CD40 5D12 VH (SEQ ID NO:34)

QVKLEESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRYSVYVWRQPPGKGLWLGMMWGGGSTDY  
NSALKSRLSISKDTSKQVFLKMNSLQD DDTAMYCVRTDGDYWGQGTSVTVSS

anti-CD19 HD37 VL (SEQ ID NO:35)

DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP  
PRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

anti-CD19 HD37 VH (SEQ ID NO:36)

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGGLEWIGQIWPGDGDT  
NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQ  
TSVTVSS

anti-CD19 21D4 VL (SEQ ID NO:37)

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRF  
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK

anti-CD19 21D4 VH (SEQ ID NO:38)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSSSWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPDDSDTRY  
SPSFQGQVTISADKSIRTAYLQWSSLKASDTAMYICARHVTMWGVIIIDFWGQGTTLTVSS

anti-CD19 de ratón 4G7 VL (SEQ ID NO:39)

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISSCRSSKLLNSNGNTYLWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASG  
VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK

anti-CD19 de ratón 4G7 VH (SEQ ID NO:40)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKY  
NEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVS  
S