

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 482**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014 PCT/EP2014/002234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014 E 14755987 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 3033357**

54 Título: **Nuevos anticuerpos anti-receptor IIB de Fc gamma y usos de los mismos**

30 Prioridad:

16.08.2013 EP 13004094

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

18.05.2018

73 Titular/es:

**SUPREMOL GMBH (100.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried/München, DE**

72 Inventor/es:

**SONDERMANN, PETER;
POHL, THOMAS;
TER MEER, DOMINIK;
CARLE, ANNA;
EHEHALT DANIELA y
RIETH, NICOLE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 668 482 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

Nuevos anticuerpos anti-receptor IIB de Fc gamma y usos de los mismos

- 5 Los receptores Fc γ RII, miembros de la superfamilia de proteínas de genes de inmunoglobulinas, son glicoproteínas unidas a membranas integrales de 40 kDa de una sola cadena de polipéptido que se componen de dos dominios de inmunoglobulina extracelulares, un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de longitud variable.
- 10 Los receptores Fc γ RII se expresan en una variedad de células hematopoyéticas y son los únicos receptores de Fc en plaquetas y megacariocitos humanos (Cassel, McKenzie, 1993). Se conocen tres tipos de receptor Fc γ RII en humanos, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC, que se unen todos a IgG (por ejemplo, IgG₁ con una afinidad de $1-2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) o complejos inmunitarios (IC, por ejemplo patógenos opsonizados por IgG). Fc γ RIIA y Fc γ RIIB varían entre sí debido principalmente a diferencias en los dominios citoplasmáticos que conducen en última instancia a respuestas funcionalmente heterogéneas tras el ligamiento del receptor. La activación de Fc γ RIIA conduce a que se active la célula (por ejemplo, fagocitosis, estallido respiratorio) y Fc γ RIIB inicia señales inhibitoras que dan como resultado,
- 15 por ejemplo, la inhibición de la activación de células B. Fc γ RIIC comparte el dominio extracelular de Fc γ RIIB y el dominio citoplasmático de Fc γ RIIA, transfiriendo por tanto señales activadoras tras la unión de IgG o IC. Fc γ RIIB se expresa en todos los leucocitos a excepción de células T y linfocitos citolíticos naturales y es el único receptor de Fc inhibitor expresado en células B humanas. Los monocitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos y mastocitos coexpresan el receptor activante Fc γ RIIA y el receptor inhibitor Fc γ RIIB y Fc γ RIIC se expresan en linfocitos citolíticos naturales (células NK) y constituye el único Fc γ R en este tipo de célula. Se conocen dos isoformas para Fc γ RIIB que difieren en su función biológica. Fc γ RIIB-1 se expresa exclusivamente en células B, mientras que Fc γ RIIB-2, que provoca la inducción de endo/fagocitosis tras la unión a IC, se encuentra en todas las demás células que expresan Fc γ RIIB (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).
- 20 Fc γ RIIB comparte una homología del 93 % en la región extracelular con Fc γ RIIA. Tal como se indicó anteriormente, la principal diferencia entre Fc γ RIIA y Fc γ RIIB se encuentra en el dominio citoplasmático. Mientras que Fc γ RIIA comprende un ITAM (motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptores), Fc γ RIIB comprende un ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptores).
- 25 La agrupación de Fc γ RIIA mediante la unión de IC conduce a la colocalización del motivo ITAM con cinasas asociadas a receptor que efectúan la fosforilación de residuos de tirosina en el motivo ITAM (secuencia consenso: Y-X₂-L/I-X₈-Y-X₂-L/I, Isakov, 1997) y la posterior interacción con la cinasa Syk, que efectúa la activación de la célula mediante numerosos eventos de activación génica y señalización posteriores (Ghazizadeh *et al.*, 1994). La unión de inmunoglobulinas al Fc γ RIIA activador provoca una respuesta proinflamatoria que conduce posteriormente a la retirada de patógenos pero en caso de autoanticuerpos también puede conducir a la destrucción de tejidos sanos produciendo un repunte de la enfermedad autoinmunitaria patológica. Por tanto, es necesario un control estricto de la especificidad de anticuerpo y un sistema de realimentación negativa para solventar el daño aberrante al organismo por el sistema inmunitario. El receptor inhibitor Fc γ RIIB forma parte de este sistema de realimentación negativa.
- 30 Fc γ RIIB se caracteriza por la presencia de un motivo ITIM (secuencia consenso: V/I-X-Y-X₂-V/L, Isakov, 1997) en el dominio citoplasmático, que se fosforila por la cinasa Lyn tras la unión de agregados de Ig o IC y ligamiento conjunto con receptores de Fc γ activadores que portan ITAM. El ITAM fosforilado atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza a su vez mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por Fc γ R que contiene ITAM, impidiendo por consiguiente el flujo de entrada de Ca²⁺ intracelular. La reticulación de Fc γ RIIB inhibe la respuesta de activación al ligamiento de Fc γ R que inhibe a su vez la activación y proliferación de células B, y secreción de anticuerpos.
- 35 Fc γ RIIB tiene dos actividades inhibitoras. Tal como se mencionó anteriormente, una de estas depende del motivo ITIM y se produce cuando se liga Fc γ RIIB a un receptor que porta ITAM (por ejemplo, Fc γ RIIA) dando como resultado la inhibición de la proliferación celular y la movilización de calcio desencadenadas por ITAM. Esto significa que procesos dependientes de calcio tales como desgranulación, fagocitosis, ADCC, liberación de citocinas y activación proinflamatoria, y también la proliferación de células B se bloquean por Fc γ RIIB. La segunda actividad inhibitora de Fc γ RIIB implica homoagregación del receptor en células B (agrupación de Fc γ RIIB). La homoagregación suministra una señal proapoptótica en el citoplasma que puede bloquearse mediante ligamiento de Fc γ RIIB al receptor de células B (BCR). La señalización de BCR tras unión a antígeno multivalente se caracteriza por la fosforilación del BCR agrupado por Lyn, una cinasa de la familia de Src. Esta fosforilación efectuada por Lyn coincide con la asociación del BCR con microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol que se denominan balsas lipídicas. Estas balsas lipídicas insolubles desempeñan un papel importante en la formación de la sinapsis inmunitaria. Se ha observado que la interacción de BCR con antígeno en una APC (célula presentadora de antígeno) conduce a la formación de esta sinapsis inmunitaria en la superficie de contacto de la célula B y APC comprometidas. El ligamiento conjunto de Fc γ RIIB con el BCR desestabiliza la asociación del BCR con balsas lipídicas, bloqueando posteriormente la formación de la sinapsis inmunitaria de células B. La inhibición de Fc γ RIIB de la señalización de BCR implica la fosforilación de los residuos de tirosina en el ITIM del dominio citoplasmático del
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

receptor por la cinasa Lyn y el posterior reclutamiento de la inositol fosfatasa SHIP (Daeron *et al.*, 1995, Ravetch y Bolland, 2001). Se acepta por la comunidad científica, que Fc γ RIIB puede considerarse un punto de control tardío durante el desarrollo de células B periféricas y que también regula directamente la supervivencia de células plasmáticas. Por tanto, se considera que Fc γ RIIB es una diana valiosa para el tratamiento de trastornos de células B y especialmente respuestas inmunitarias mediadas por células B.

Los estudios en ratones y humanos ya han dilucidado la influencia de Fc γ RIIB sobre la tolerancia humoral y la actividad de células B, en las que una expresión reducida o ausente de Fc γ RIIB dio como resultado el desarrollo o el empeoramiento de enfermedades autoinmunitarias manifiestas. En efecto, Fc γ RIIB desempeña un papel clave en el desarrollo y la evolución de enfermedades autoinmunitarias tales como trombocitopenia inmunitaria primaria, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), pénfigo ampolloso, pénfigo vulgar y otras formas de pénfigo, esclerosis múltiple dirigida por células B, y otras enfermedades autoinmunitarias caracterizadas por el desarrollo de complejos inmunitarios patógenos. Durante una reacción inmunitaria en un individuo sano, los patógenos que han entrado en la circulación sanguínea se opsonizan por anticuerpos (inmunoglobulinas, Ig) dirigidos contra epítopos de los organismos patógenos, lo que conduce a su vez a la formación de los denominados complejos inmunitarios. Estos complejos inmunitarios se fagocitan posteriormente por células específicas del sistema inmunitario (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, fagocitos) lo que conduce a una eliminación de los organismos patógenos de la circulación sanguínea. También se mostró que Fc γ RIIB desempeña un papel fundamental en la tolerancia periférica puesto que ratones deficientes en Fc γ RIIB desarrollan enfermedades autoinmunitarias espontáneas. Las deficiencias en Fc γ RIIB conducen a susceptibilidad a enfermedad autoinmunitaria inducida (Bolland y Ravetch, 2000).

En pacientes que padecen una enfermedad autoinmunitaria, la expresión de Fc γ RIIB en células B habitualmente se modera o reduce en comparación con personas sanas. Mientras que, por ejemplo, las células B indiferenciadas muestran una expresión normal de Fc γ RIIB, las células B de memoria y los blastos plasmáticos de pacientes con AR muestran una expresión reducida de este receptor (Catalán, 2010). Xiang y colaboradores también fueron capaces de mostrar que la reticulación de Fc γ RIIB en blastos plasmáticos de donantes sanos mediante el anticuerpo anti-Fc γ RIIB acoplado a la superficie, 2.4G2, conduce a apoptosis (Xiang *et al.*, 2007).

Basándose en el papel evidente de Fc γ RIIB en enfermedades autoinmunitarias tal como se describió anteriormente, se han desarrollado anticuerpos contra el receptor para ser capaces de tratar o diagnosticar pacientes. El documento WO 2009/083009 divulga anticuerpos contra ambas isoformas de Fc γ RIIB, mientras que el documento WO 2004/016750 divulga anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de Fc γ RIIB expresado de manera endógena en una célula humana con una afinidad al menos 10 veces mayor que se unen tales anticuerpos a Fc γ RIIA expresado en una célula humana, teniendo en cuenta que el dominio extracelular de Fc γ RIIB y Fc γ RIIA comparten un alto grado de identidad. El documento EP 1 709 073 divulga anticuerpos que son sumamente específicos para Fc γ RIIB y su uso para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, infecciones, tumores y otros estados anómalos.

Con tal propósito, es muy aconsejable usar anticuerpos con alta especificidad y afinidad para el receptor. Especialmente, una alta especificidad reduce el riesgo de reacciones cruzadas del anticuerpo y de ese modo de efectos secundarios adversos y una alta afinidad aumenta la efectividad y eficacia de su aplicación. También es conveniente que tales anticuerpos no sean bloqueantes, es decir que su unión al receptor de Fc mediante su región variable no interfiera en la unión de complejos inmunitarios (IC) o IgG agregadas a las células. Además, una propiedad enormemente ventajosa deseada de un anticuerpo contra Fc γ RIIB es que afecte al mecanismo de acoplamiento inhibitorio de Fc γ RIIB para controlar la activación de células B. Concretamente, se sabe que la parte intracelular de Fc γ RIIB contiene un denominado ITIM y que la señalización a través de receptores que portan ITIM es habitualmente inhibitoria en la regulación del sistema inmunitario. Tal como se describió anteriormente, se sabe que Fc γ RIIB tiene una función reguladora inhibitoria cuando se une a la parte Fc de moléculas de IgG. Así, se desea aprovechar la función reguladora inhibitoria de Fc γ RIIB con el objetivo de controlar células B que están implicadas, entre otras, en enfermedades autoinmunitarias. En conjunto, aunque la técnica anterior ya divulgaba varios anticuerpos anti-Fc γ RIIB con diferentes especificidades y afinidades, todavía existía una demanda de anticuerpos anti-Fc γ RIIB mejorados para usarse en el tratamiento, la profilaxis y el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias en un sujeto.

La presente solicitud satisface esta demanda mediante la provisión de los anticuerpos descritos a continuación en el presente documento, caracterizados en las reivindicaciones e ilustrados en las figuras y los ejemplos adjuntos.

Para su gran sorpresa, los presentes inventores observaron que los anticuerpos proporcionados por la presente invención aumentan notablemente la fosforilación de ITIM. En comparación con anticuerpos divulgados en la técnica anterior que también se unen específicamente a Fc γ RIIB, los anticuerpos según la presente invención muestran sorprendentemente un efecto mucho más fuerte en la fosforilación de ITIM de lo que podía haberse esperado. Un efecto más fuerte de este tipo resulta ventajoso. En particular, el acoplamiento de activación-inhibición, el emparejamiento de una señal positiva con un bucle inhibitorio, controla la magnitud y duración de muchos procesos biológicos. En linfocitos B, el reconocimiento de un antígeno por el receptor de células B (BCR) clonotípico induce

una señal que puede dirigir la expansión clonal, diferenciación, la liberación de citocinas y, en última instancia, la producción de Ig. La activación descontrolada se previene agotando el estímulo de activación así como desencadenando un bucle de realimentación negativa que implica la participación de un receptor de Fc γ inhibitor (Fc γ R), Fc γ RIIb (CD32B). Este último mecanismo se desencadena cuando el BCR reconoce antígeno en complejo inmunitario, dando como resultado la participación concomitante de CD32B por el dominio de Fc de la IgG unida a complejo, previniendo así la expansión de clones de células B que comparten la misma especificidad que la reconocida por la IgG soluble. Por tanto, una estrategia reguladora negativa satisfactoria debe formar la base molecular para el bucle de señalización negativa. Los anticuerpos proporcionados por la presente invención muestran un efecto notablemente más fuerte en la fosforilación de ITIM de CD32B y, por tanto, se espera que tengan un impacto más fuerte sobre el bucle de señalización negativa desencadenado por la fosforilación de ITIM de CD32B que a su vez controla las células B que están implicadas, entre otras cosas, en enfermedades autoinmunitarias. Específicamente, los anticuerpos de la presente invención aumentan la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIb de células de Daudi en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo. El aumento es de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. A partir de anticuerpos de la técnica anterior que se unen a CD32B, las propiedades ventajosas de los anticuerpos de la presente invención no podrían haberse esperado ni previsto, mucho menos habría habido ninguna expectativa razonable de éxito de proporcionarlas, en particular, las CDR o cadena pesada y/o ligera variable tal como se caracterizan en el presente documento. Además de esta propiedad mejorada de los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos descritos en el presente documento que también tienen una alta especificidad por Fc γ RIIb humano y/o no son bloqueantes, es decir, que su unión al receptor de Fc mediante su(s) región/regiones variable(s) no interfiere con la unión de complejos inmunitarios (IC) o IgG agregada a las células.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Fc γ RIIb, preferiblemente de tipo IgG, que comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 29, 30 y 31 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 32, 33 y 34. Un anticuerpo de este tipo aumenta la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIb de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo. A partir de la figura 7 resulta evidente que los anticuerpos de la técnica anterior GB3 (véase el documento WO 2005/051999) y 2B6 (véase el documento WO 2004/016750) no son capaces de aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIb como puede aumentarse por un anticuerpo de la presente invención, tal como 8A6 (ya sea como anticuerpo 8A6 quimérico o humanizado). Por tanto, la capacidad o incapacidad, respectivamente, de aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIb parece depender de las CDR, particularmente de algunos residuos clave que están presentes en 8A6, pero no en GB3 y/o 2B6, respectivamente. Por tanto, los aminoácidos que sólo están presentes en CDR de 8A6 en posiciones que corresponden a las posiciones respectivas dentro de una CDR de 2B6 o GB3 pueden considerarse "residuos clave".

Una comparación visual de las CDR de 2B6, GB3 y 8A6 para determinar residuos clave revela que un anticuerpo de la presente invención comprende en H-CDR1 la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29, en H-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 30, en H-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 31, en L-CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 32, en L-CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 33 y en L-CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 34.

Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las CDR de 8A6, GB3 y 2B6 también pueden expresarse como grado de identidad (en % de identidad) que se permite en las CDR de un anticuerpo de la presente invención cuando se usan las CDR de 8A6 como secuencias de referencia. Por consiguiente, una H-CDR1 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 60 % o más, tal como el 70 %, 80 % o 90 % a la H-CDR1 tal como se muestra en SEQ ID NO. 20. Una H-CDR2 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 36 % o más, tal como el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % a la H-CDR2 tal como se muestra en SEQ ID NO. 21. Una H-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 50 % o más, tal como el 60 %, 70 %, 80 % o 90 % a la H-CDR3 tal como se muestra en SEQ ID NO. 22. Una L-CDR1 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 64 % o más, tal como el 70 %, 80 % o 90 % a la L-CDR1 tal como se muestra en SEQ ID NO. 23. Una L-CDR2 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 29 % o más, tal como el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % a la L-CDR2 tal como se muestra en SEQ ID NO. 24. Una L-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente por ser idéntica en el 78 % o más, tal como el 80 % o 90 % a la L-CDR3 tal como se muestra en SEQ ID NO. 25.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Fc γ RIIb que comprende en su región variable de cadena pesada una secuencia de H-CDR1 que es idéntica en el 60 % o más a la secuencia de H-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 20, una secuencia de H-CDR2 que es idéntica en el 36 % o más a la secuencia de H-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 21, una secuencia de H-CDR3 que es idéntica en el 50 % o más a la secuencia de H-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 22, una secuencia de L-CDR1 que es idéntica en el 64 % o más a la secuencia de L-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 23, una secuencia de L-CDR2 que es idéntica en el 29 % o más a la secuencia de L-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 24, y una secuencia de L-CDR3 que es idéntica en el 78 % o más a la

secuencia L-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 25. Preferiblemente, un anticuerpo de este tipo todavía comprende en sus CDR de región variable de cadena pesada y ligera los “residuos clave” tal como se definen en las SEQ ID NO. 29, 30, 31 (H-CDR) y tal como se definen en las SEQ ID NO. 32, 33 y 34 (L-CDR). Un anticuerpo de este tipo aumenta preferiblemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “% de identidad” se refiere al porcentaje de residuos de aminoácido idénticos en la posición correspondiente dentro de la secuencia cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos con una alineación de secuencia óptima tal como se muestra a modo de ejemplo por las técnicas ClustalW o X disponibles de www.clustal.org, o técnicas equivalentes. Por ejemplo, en el caso de alineaciones de CDR, cada una de las CDR (de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente) mostradas en las SEQ ID NO. 20-25 sirve como secuencia de referencia para una secuencia de CDR de interés de una región variable de cadena pesada o ligera, respectivamente, por ejemplo H-CDR1 de SEQ ID NO. 20 se alinea con una H-CDR1 de interés. Por consiguiente, se alinean ambas secuencias (secuencia de referencia y secuencia de interés), se identifican residuos de aminoácido idénticos entre ambas secuencias y se divide el número total de aminoácidos idénticos entre el número total de aminoácidos (longitud de aminoácidos) de SEQ ID NO. 20, 21, 22, 23, 24 o 25, respectivamente, dependiendo de si se alinean H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3. El resultado de esta división es un valor en porcentaje, es decir valor/grado de identidad en porcentaje.

Las secuencias de H-CDR1 mostradas en las SEQ ID NO. 14 y 20 son secuencias de especies preferidas de la H-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 29. Las secuencias de H-CDR2 mostradas en las SEQ ID NO. 15 y 21 son secuencias de especies preferidas de la H-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 30. Las secuencias de H-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 16 y 22 son secuencias de especies preferidas de la H-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 31. Las secuencias de L-CDR1 mostradas en las SEQ ID NO. 17 y 23 son secuencias de especies preferidas de la L-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 32. Las secuencias de L-CDR2 mostradas en las SEQ ID NO. 18 y 24 son secuencias de especies preferidas de la L-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 33. Las secuencias de L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 19 y 25 son secuencias de especies preferidas de la L-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 34.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-Fc γ RIIB, preferiblemente de tipo de IgG, que (a) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 14, 15 y 16 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 17, 18 y 19; o

(b) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 20, 21 y 22 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 23, 24 y 25,

en el que dicho anticuerpo aumenta preferiblemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.

Los anticuerpos anti-Fc γ RIIB que comprenden en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 14, 15 y 16 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 17, 18 y 19, o que tienen en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 20, 21 y 22 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 23, 24 y 25 son anticuerpos preferidos. Estos anticuerpos preferidos aumentan preferiblemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.

Un “anticuerpo”, cuando se usa en el presente documento, es una proteína que comprende uno o más polipéptidos (que comprende uno o más dominios de unión, preferiblemente dominios de unión a antígeno) sustancialmente o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa de manera intercambiable con “anticuerpo” en el presente documento. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. En particular, un “anticuerpo”, cuando se usa en el presente documento, es normalmente proteínas glicosiladas tetraméricas compuestas por dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. En los anticuerpos pueden encontrarse dos tipos de cadena ligera, denominados lambda y kappa. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, prefiriéndose IgG en el contexto de la presente invención. También se prevé un anticuerpo de la presente invención que tiene un dominio constante de IgE o parte del mismo que se une al receptor I de Fc épsilon. Un anticuerpo de IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a

antígeno, mientras que los anticuerpos de IgA comprenden desde 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas que pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, generalmente la unidad de 4 cadenas tiene aproximadamente 150.000 Dalton. Cada cadena ligera incluye un dominio (VL) variable (V) N-terminal y un dominio (CL) constante (C). Cada cadena pesada incluye un dominio V (VH) N-terminal, tres o cuatro dominios C (CH) y una región de bisagra. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero pueden mostrar diversas funciones efectoras, tales como participación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Si un anticuerpo debe ejercer ADCC, es preferiblemente del subtipo IgG1, mientras que el subtipo IgG4 no tendrá la capacidad de ejercer ADCC.

Cuando se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" no sólo se refiere a una inmunoglobulina (o anticuerpo intacto) sino que también se refiere a un fragmento de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un fragmento de unión a antígeno o un dominio de unión a antígeno. Preferiblemente, el fragmento tal como Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, Fv unidos por enlaces disulfuro (sdFv) y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno tal como se describe en el presente documento. Normalmente, tales fragmentos comprenderán un dominio de unión a antígeno y tendrán las mismas propiedades que los anticuerpos descritos en el presente documento.

El término "anticuerpo" también incluye, pero no se limita a, pero abarca, anticuerpos monoclonales, monoespecíficos, poli o multi-específicos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, camelizados, humanos, de cadena sencilla, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, con injertos y generados *in vitro*, prefiriéndose los anticuerpos quiméricos o humanizados. El término "anticuerpo humanizado" se define comúnmente para un anticuerpo en el que las CDR que codifican para la especificidad de HC y LC se han transferido a una región de entramado variable humana apropiada ("injerto de CDR"). El término "anticuerpo" también incluye scFv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos o tetracuerpos, anticuerpos de dominio (dAb) y nanocuerpos. En los términos de la presente invención, el término "anticuerpo" también comprenderá anticuerpos bi, trí o multiméricos o bi, trí o multifuncionales que tienen varios sitios de unión a antígeno, preferiblemente al menos uno de ellos es un sitio de unión específico de Fc γ RIIB.

Además, el término "anticuerpo" tal como se emplea en la invención también se refiere a derivados de los anticuerpos (incluyendo fragmentos) descritos en el presente documento. Un "derivado" de un anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácido. Adicionalmente, un derivado abarca anticuerpos que se han modificado mediante una unión covalente de una molécula de cualquier tipo al anticuerpo o proteína. Los ejemplos de tales moléculas incluyen azúcares, PEG, grupos hidroxilo, etoxilo, carboxilo o amina, pero no se limitan a éstos. En efecto, las modificaciones covalentes de los anticuerpos conducen a la glicosilación, pegilación, acetilación, fosforilación, amidación, sin limitarse a éstos.

El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo "aislado". "Aislado", cuando se usa para describir anticuerpos divulgados en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, el anticuerpo aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los que resultan de células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirán normalmente con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. Sin embargo, habitualmente se preparará un anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente" se refiere a anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que se unen específicamente a Fc γ RIIB o a un fragmento del mismo y no se unen específicamente a otros receptores de Fc. Los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos según la invención se unen a Fc γ RIIB a través del dominio variable del anticuerpo. Sin embargo, estos anticuerpos también pueden unirse al RIIB de Fc gamma a través de su dominio de Fc.

El emparejamiento de una VH y VL conjuntamente forma un único sitio de unión a antígeno. El dominio de CH más proximal a VH se denomina CH1. Cada cadena L se une a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Los dominios de VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones de entramado (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayor parte de los residuos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Por consiguiente, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1 o H-CDR1, H2 o H-CDR2 y H3 o H-CDR3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1 o L-CDR1, L2 o L-CDR2 y L3 o L-CDR3.

El término "variable" se refiere a las partes de los dominios de inmunoglobulina que muestran variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y la afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el/los "dominio(s) variable(s)"). La variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de todos los dominios variables de anticuerpos; está concentrada en subdominios de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos subdominios se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR). Los términos "CDR", y su plural "las CDR", se refieren a una región determinante de la complementariedad (CDR) de las que tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (L1-CDRL1, L2-CDR y L3-CDR) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (H1-CDR, H2-CDR y H3-CDR). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de andamiaje o entramado. Los límites y longitudes de CDR de definición exactos se someten a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por tanto, puede hacerse referencia a las CDR mediante definiciones de Kabat, Chothia, de contacto o cualquier otra definición de límites, incluyendo el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de límites discrepantes, cada uno de estos sistemas tiene cierto grado de solapamiento en lo que constituye las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por tanto, las definiciones de CDR según estos sistemas pueden diferir en cuanto a la longitud y zonas de límite con respecto a la región de entramado adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat, Chothia y/o MacCallum *et al.*, (Kabat *et al.*, ya citado; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol, 1987, 196: 901; y MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Sin embargo, se prefiere la numeración según el denominado sistema de Kabat.

Las regiones variables preferidas de un anticuerpo de la presente invención se muestran en las SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 4.

El término "región de entramado" se refiere a las partes reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existe entre las CDR más divergentes (es decir, hipervariables). Tales regiones de entramado se denominan normalmente regiones de entramado 1 a 4 (FR1, FR2, FR3 y FR4) y proporcionan un andamiaje para la presentación de las seis CDR (tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera) en el espacio tridimensional, para formar una superficie de unión a antígeno.

Los anticuerpos (incluyendo fragmentos y derivados de los mismos) de la presente invención aumentan preferible o ventajosamente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente 4 o más veces, tal como aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más o aproximadamente 10 veces (es decir, incluso casi 10 veces) en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo. Para esa comparación, tanto un anticuerpo de la presente invención se usa en una cantidad dentro del intervalo de 5 μ g/ml a 50 μ g/ml, tal como 10, 15, 20 o 25 μ g/ml.

A partir de los resultados mostrados en las figuras 6, 7 y 8, resulta evidente que ya sea el anticuerpo 8A6 quimérico (ch8A6) (que comprende regiones variables de rata y una región constante humana) o el anticuerpo 8A6 humanizado (hu8A6) aumenta notablemente la fosforilación de ITIM en comparación con el anticuerpo GB3 de la técnica anterior. Teniendo en cuenta que las CDR entre los anticuerpos 8A6 quimérico y humanizado son casi idénticas, mientras que sus regiones de entramado (FR) son diferentes, y la potencia de ambos anticuerpos para aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB es casi la misma (véase la figura 8), resulta razonable concluir que las CDR son causantes de la propiedad ventajosa de los anticuerpos de la presente invención para aumentar notablemente la fosforilación de ITIM, por ejemplo, en comparación con el anticuerpo GB3. El experto está fácilmente en situación de injertar las CDR tal como se describen en el presente documento para los anticuerpos de la presente invención en un entramado apropiado o, a la inversa, injertar regiones de entramado en un anticuerpo que tiene las CDR de un anticuerpo de la presente invención, de manera que el anticuerpo así resultante tiene las propiedades ventajosas, en particular la propiedad de aumentar la fosforilación de ITIM de CD32B tal como se describe en el presente documento.

Tal como se menciona, los anticuerpos de la presente invención tienen preferible o ventajosamente la propiedad de aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB (CD32B) de células de Daudi, por ejemplo, en comparación con el anticuerpo GB3 de la técnica anterior descrito en el documento WO 2005/051999, que se caracteriza porque tiene la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 7 del documento WO 2005/051999 (véase SEQ ID NO. 26) y la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 5 del documento WO 2005/051999 (véase SEQ ID NO. 27).

Preferiblemente, el aumento de la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB (CD32B) de células de Daudi realizado por un anticuerpo abarcado por la presente invención es de aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más o aproximadamente 10 veces (es decir, incluso casi 10 veces) en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.

La fosforilación de ITIM de CD32B (receptor IIB de Fc gamma) de células de Daudi se determina preferiblemente de la siguiente manera:

5 3x10⁵ células de Daudi suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS (suero bovino fetal) al 1 % o bien se dejan sin tratar (control) o bien se incuban durante 25 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % con una mezcla de anticuerpos que contiene anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo) en la que la mezcla de anticuerpos comprende α -hIgM (AcM, clon UHB) 2 μ g/ml y α -mIgG 20 μ g/ml. Posteriormente se
 10 el anticuerpo GB3 del documento WO 2005/051999, respectivamente, ambos anticuerpos se aplican preferiblemente a una concentración igual, y opcionalmente con tampón como control (w/o). Se recogen las células tras la incubación a 4 °C, se someten a lisis y se someten a análisis por inmunotransferencia Western Blot, mediante lo cual se detecta la fosforilación mediante un anticuerpo (anti-)fosfotirosina (anticuerpo anti-CD32B (fosfo Y292)). La inmunotransferencia Western Blot se analiza con sonda opcionalmente con un anticuerpo que detecta, por ejemplo,
 15 β -actina que sirve como control de carga para el análisis por inmunotransferencia Western Blot. Como alternativa a células de Daudi, pueden usarse CMSP o células Raji. Por consiguiente, en todas las realizaciones que aplican células de Daudi cuando se determina la fosforilación de ITIM, pueden sustituirse las células de Daudi por células Raji o CMSP.

20 El anticuerpo frente a fosfotirosina se acopla preferiblemente a un grupo generador de señal. Un grupo generador de señal se refiere a una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen radiomarcadores tales como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I; colorantes fluorescentes (por ejemplo, Cy-3, Cy-5); cromóforos, reactivos electrodensos; enzimas que generan una señal detectable (por ejemplo, tal como se usa comúnmente en un ELISA); o marcadores de espín. El marcador o
 25 resto detectable tiene o genera una señal medible, tal como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que puede usarse para cuantificar la cantidad de resto detectable unido en una muestra. El grupo generador de señal puede estar unido de manera covalente o no covalente al anticuerpo frente a fosfotirosina. Una señal puede determinarse mediante la señal proporcionada por el grupo generador de señal de un anticuerpo frente a fosfotirosina. La señal puede ser cualquier señal que es detectable, por ejemplo, mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

Un aumento de la fosforilación de ITIM se determina comparando (i) la señal generada a partir del grupo generador de señal del anticuerpo frente a fosfotirosina unido al motivo ITIM de CD32B de células que no se trataron ("valor de referencia") con (ii) la señal generada a partir del grupo generador de señal del anticuerpo frente a fosfotirosina
 35 unido al motivo ITIM de CD32B de células que se trataron con un anticuerpo abarcado por la presente invención, mediante lo cual si la señal (ii) es mayor que la señal (i) se realizó un aumento de la fosforilación de ITIM de CD32B por un anticuerpo abarcado por la presente invención. Para esa comparación se usa un anticuerpo de la presente invención en una cantidad dentro del intervalo de 5 μ g/ml a 50 μ g/ml, tal como 10, 15, 20 o 25 μ g/ml. Por ejemplo, cuando se compara el anticuerpo GB3 de la técnica anterior o cualquier otro anticuerpo que se une a CD32B
 40 (denominados colectivamente "anticuerpo de interés"), preferiblemente uno que se une al epítipo en CD32B tal como se describe en el presente documento y/o que no es bloqueante tal como se describe en el presente documento, con un anticuerpo abarcado por la presente invención con el fin de determinar la capacidad de un anticuerpo de interés y un anticuerpo abarcado por la presente invención en cuanto a en cuantas veces puede aumentar cada anticuerpo la fosforilación de ITIM de CD32B, se determina la fosforilación de ITIM tal como se describió anteriormente para el anticuerpo de interés y un anticuerpo abarcado por la presente invención. Concretamente, se obtiene un valor para la comparación de un anticuerpo de interés con células no tratadas y un valor para la comparación de un anticuerpo abarcado por la presente invención con células no tratadas. Estos valores pueden compararse entre sí con el fin de determinar si un anticuerpo abarcado por la presente invención tiene la capacidad para aumentar la fosforilación de ITIM en mayor medida, tal como de 4 a 10 veces (incluyendo 4,
 45 5, 6, 7, 8, 9, 10) que un anticuerpo de interés. Para esa comparación, preferiblemente se usan un anticuerpo de interés y un anticuerpo de la presente invención en una cantidad dentro del intervalo de 5 μ g/ml a 50 μ g/ml, tal como 10, 15, 20 o 25 μ g/ml.

El término "receptor IIB de Fc gamma" se usa en el presente documento de manera intercambiable con "Fc γ RIIB" o
 55 "receptor IIB de Fc-gamma" o "receptor IIB de Fc γ " o "Fc γ RIIB" y comprende tanto Fc γ RIIB membranoso como Fc γ RIIB soluble (es decir, la parte extracelular de un receptor IIB de Fc γ). Dicho término también incluye variantes de Fc γ RIIB tales como Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 que difieren una de otra en una inserción de secuencia de 19 aminoácidos en el dominio citoplasmático de Fc γ RIIB1. Otra variante abarcada por dicho término es Fc γ RIIB3 que es idéntica a Fc γ RIIB2, pero carece de información para el supuesto sitio de escisión de peptidasa señal. Algunas veces, Fc γ RIIB también se denomina en el presente documento "CD32B". Por tanto, este término, así como los demás términos usados para designar receptor IIB de Fc gamma tal como se describió anteriormente, puede usarse de manera intercambiable con el término "CD32B". El receptor IIB de Fc gamma pertenece a la superfamilia de proteínas de inmunoglobulina y se encuentra en muchos linajes hematopoyéticos. Tal como indica su nombre, el receptor IIB de Fc reconoce y se une a la parte Fc (fragmento, cristalizable) de anticuerpos, es decir el fragmento que corresponde
 60 a los dos dominios C-terminales de ambas cadenas pesadas del anticuerpo e interacciona normalmente con células

y moléculas efectoras. En SEQ ID NO. 5 se muestra un Fc γ R1IB preferido. En SEQ ID NO. 12 se muestra un Fc γ R1IB soluble preferido.

“Fc γ R1IB soluble” también se denomina “sFc γ R1IB”. Tal como se usa en el presente documento, el término “receptor IIB de Fc γ soluble” y términos análogos se refieren a la parte extracelular del receptor IIB de Fc γ . Tal parte puede disolverse en un líquido. En general, las formas solubles de cualquier clase, isoforma o alelo de Fc γ R pueden identificarse mediante una “s” antepuesta, por ejemplo, sCD32 o sFc γ R1I se refieren al receptor R1I de Fc gamma soluble. Normalmente, a diferencia de Fc γ R membranoso (es decir, unido a membrana), Fc γ R soluble no comprende una región transmembrana o una cola intracitoplasmática.

Preferiblemente, el Fc γ R1IB de la invención es de origen humano o un Fc γ R1IB humano. El término “de origen humano” debe interpretarse en su sentido más amplio. En general, significa que un Fc γ R (o una región o fragmento del mismo) se parece o es similar a un Fc γ R humano (es decir, la proteína encontrada en el cuerpo humano) en cuanto a la secuencia de aminoácidos y/o estructura.

Alternativamente, el Fc γ R1IB “de origen humano” puede ser un Fc γ R1IB recombinante que se obtiene mediante expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula huésped, por ejemplo tal como se describe por Sondermann y Jacob (1999), *Bioll. Chem.* 380(6), 717-721. En resumen, se obtiene un gen de interés a partir de un organismo y se introduce en un vector, por ejemplo un plásmido o un virus, que después se usa para transferir el gen al interior de una célula huésped que expresa el gen recombinante y produce un producto de proteína recombinante. El experto en la técnica sabrá fácilmente qué célula huésped seleccionar para obtener un Fc γ R1IB que sea adecuado, por ejemplo, para la preparación de una composición farmacéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede desearse un Fc γ R1IB no glicosilado. Entonces, el experto en la técnica puede seleccionar una célula huésped procarionta para la expresión del Fc γ R1IB que carece de la maquinaria enzimática necesaria para la glicosilación de proteínas. En una realización el Fc γ R1IB puede expresarse en procariontas y posteriormente purificarse y replegarse según la descripción del documento WO 00/32767.

En otra realización puede producirse Fc γ R1IB de manera sencilla y económica en alta pureza en sistemas de expresión eucariotas. Los sistemas útiles incluyen eucariotas con un aparato especializado para la producción de proteínas extracelulares, por ejemplo células B. Otros posibles sistemas de expresión eucariotas incluyen, pero no se limitan a, células CHO o HEK. Por tanto, dicho Fc γ R1IB soluble es Fc γ R1IB recombinante, soluble y glicosilado.

Fc γ R1IB tal como se hace referencia en el presente documento abarca además Fc γ R1IB que, en comparación con Fc γ R de tipo natural, se ha modificado o alterado con respecto a la secuencia de aminoácidos, e incluye, por ejemplo, sitios de glicosilación adicionales o similares. Sin embargo, también se prevén formas no glicosiladas de Fc γ R1IB y son una realización preferida de Fc γ R1IB.

Con respecto a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención, se prefiere que la región variable de cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 3, con al menos una de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por E, el aminoácido V en la posición 11 se reemplaza por L, el aminoácido G en la posición 42 se reemplaza por K, el aminoácido S en la posición 50 se reemplaza por V, el aminoácido Y en la posición 53 se reemplaza por S, el aminoácido K en la posición 58 se reemplaza por T, el aminoácido G en la posición 61 se reemplaza por A, el aminoácido S en la posición 75 se reemplaza por T, el aminoácido K en la posición 76 se reemplaza por R, el aminoácido N en la posición 77 se reemplaza por S y el aminoácido T en la posición 78 se reemplaza por N. Un anticuerpo de este tipo se caracteriza preferiblemente de forma que comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 6 y/o la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 7.

Un anticuerpo de la presente invención se caracteriza preferiblemente de forma que comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 6 y/o la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 7.

En un anticuerpo preferido de la invención, la región constante de la cadena pesada contiene un residuo de alanina en la posición 297 (N297A) según la numeración de proteínas de EU tal como se describe por Edelman *et al.* 1969 (corresponde a la numeración de la secuencia que se representa por SEQ ID NO. 6 tal como se muestra en la figura 2). Los anticuerpos con una cadena pesada que contiene un residuo de alanina (Ala, A) en la posición 297 (N297A) se designan en el presente documento con el sufijo “_N297A”, mientras que los anticuerpos que tienen un residuo de asparagina (Asn, N) en dicha posición son “de tipo natural” y por tanto se designan en el presente documento con el sufijo “(wt)”. Tal como puede observarse en la figura 2, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 8A6 humanizado de tipo natural termina con un residuo de aminoácido “S” en la posición 113 según la numeración de proteínas de EU. La región constante de dicho anticuerpo comienza en la posición 118. El hueco aparente resultante de 4 residuos de aminoácido lo provoca el cambio al sistema de numeración de proteínas de EU para la región constante y no significa que falte ningún residuo de aminoácido. Los anticuerpos según la invención que tienen un residuo de alanina en la posición 297 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 6 sí que tienen

- una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo reducida o ausente debido a una unión reducida o inexistente de la parte Fc del anticuerpo a receptores de Fc. La secuencia de aminoácidos de una región constante de N297A de este tipo se muestra en SEQ ID NO. 28. Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención pueden contener como región constante la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 28. Tales anticuerpos carecen de glicosilación en la posición 297 según la numeración de proteínas de EU. Por tanto, la presente invención abarca anticuerpos que carecen de glicosilación en la posición 297 según la numeración de proteínas de EU de la región constante de cadena pesada, pero también abarca anticuerpos que están glicosilados en la posición 297 según la numeración de proteínas de EU de la región constante de cadena pesada.
- En una realización preferida de la invención, el dominio constante (dominio Fc) del anticuerpo según la invención tiene el alotipo G1m17 que contiene los aminoácidos K (Lys) en la posición 214, E (Glu) en la posición 356, M (Met) en la posición 358 y A (Ala) en la posición 431, careciendo de una K (Lys) C-terminal (Beck *et al.*, 2010).
- Tal como se usa en el presente documento, el término "alotipo" se refiere al alotipo humano de los anticuerpos según la invención. Los alotipos son variantes alélicas/genéticas dentro de las secuencias de región constante de isotipos particulares. Los alotipos se heredan de una manera alélica. Por tanto, diferentes miembros de una especie diferirán unos de otros con respecto a qué alelos particulares de un isotipo dado heredan de sus progenitores. Km1 y Km2 son alotipos de cadenas kappa humanas; G1m(4) y G1m(17) son alotipos de cadenas gamma-1 humanas.
- Con respecto a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención, se prefiere que la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 4, con al menos una de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 28 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 31 se reemplaza por T, el aminoácido V en la posición 33 se reemplaza por L, el aminoácido D en la posición 34 se reemplaza por A, el aminoácido Y en la posición 49 se reemplaza por F, el aminoácido T en la posición 53 se reemplaza por N, el aminoácido Y en la posición 55 se reemplaza por A, el aminoácido L en la posición 89 se reemplaza por Q y el aminoácido N en la posición 93 se reemplaza por Y. Un anticuerpo de este tipo se caracteriza preferiblemente de forma que comprende la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 6 y/o la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 7.
- En aún otra realización de la invención, el dominio ligero constante es del alotipo Km3 que comprende los aminoácidos A (Ala) en la posición 153 y V (Val) en la posición 191.
- Un anticuerpo de la presente invención comprende preferiblemente la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 o 3 y/o la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2 o 4. Por consiguiente, un anticuerpo de la presente invención comprende preferiblemente la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2 o comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 3 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 4.
- Un anticuerpo de la presente invención comprende preferiblemente la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1, la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2, la región constante de cadena pesada la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6 y la región constante de cadena ligera la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7.
- Alternativamente, un anticuerpo de la presente invención comprende preferiblemente la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 3, la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 4, la región constante de cadena pesada la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6 y la región constante de cadena ligera la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7.
- Preferiblemente, un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos n.º 20-40 de Fc γ R1IB humano según SEQ ID NO. 5. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a una parte de un polipéptido o proteína que confiere actividad inmunogénica en un animal y al que se une específicamente un anticuerpo. Más preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que comprende el motivo GTHSPES en SEQ ID NO. 5. Se ha mostrado que este motivo de aminoácidos es un epítipo muy específico de Fc γ R1IB. Los anticuerpos que se unen específicamente a este epítipo no se unen a Fc γ R1IA humano. Preferiblemente, la unión de un anticuerpo de la invención a este epítipo mediante su(s) región/regiones variable(s) no interfiere con la unión de partes de Fc de anticuerpos al receptor y no bloquea la función fisiológica normal del receptor.
- Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se une *in vitro* a Fc γ R1IB humano con una afinidad que tiene una constante de velocidad de disociación de al menos $4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Una constante de velocidad de disociación (k_{off}) puede medirse mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial. Especialmente, puede analizarse anticuerpo que se une a sFc γ R1IB mediante resonancia de plasmón superficial usando un biosensor BIAcore T200 (GE Healthcare / Biacore).

Tal como se usa en el presente documento, el término “afinidad” se refiere a la fuerza de unión entre las regiones variables de una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo y su antígeno (por ejemplo, el receptor FcγRIIB) y se mide *in vitro*. La afinidad determina la fuerza de la interacción entre un epítipo y un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. La afinidad puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$KA = [AB-AG]/[AB]*[AG] = k_{on}/k_{off}$$

donde:

KA = constante de afinidad

[AB] = concentración molar de sitios de unión no ocupados en el anticuerpo

[AG] = concentración molar de sitios de unión no ocupados en el antígeno

[AB-AG] = concentración molar del complejo de anticuerpo-antígeno

Tal como se usa en el presente documento, el término “avidez” se refiere a la medida de la fuerza global de un complejo de anticuerpo-antígeno, que en efecto depende de los parámetros (1) afinidad del anticuerpo para el epítipo, (2) valencia del anticuerpo y antígeno y (3) la disposición estructural de las partes que interaccionan.

La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo descrito en el presente documento. Tal como se usan en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos” o “secuencias de nucleótidos” se refieren a moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), ARN (ARNm), combinaciones de los mismos o moléculas híbridas que se componen de ADN y ARN. Los ácidos nucleicos pueden ser bi o monocatenarios y pueden contener fragmentos bi y monocatenarios al mismo tiempo. Las más preferidas son las moléculas de ADN bicatenario. Según la presente invención, una secuencia de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de la invención comprende nucleótidos que codifican al menos para aquellas partes del anticuerpo que confieren las propiedades de unión específica del anticuerpo según la invención. Preferiblemente la secuencia de ácido nucleico según la invención codifica para las regiones variables, preferiblemente al menos las CDR tal como se describe en el presente documento. Ejemplos preferidos de secuencias de ácido nucleico según la invención se representan por SEQ ID NO. 8-11. Un experto en la técnica será consciente de que estas secuencias de nucleótidos pueden variar dependiendo de los métodos de expresión empleados y los sistemas usados para los mismos.

La presente invención proporciona además un vector de ácido nucleico que comprende al menos una de las secuencias de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento que codifican para un anticuerpo de la presente invención. El vector comprende preferiblemente un promotor bajo cuyo control se colocan las secuencias de ácido nucleico anteriores. El vector puede ser un vector de expresión procariota o eucariota, en el que el ácido nucleico recombinante se expresa o bien solo o bien en fusión con otros péptidos o proteínas.

La invención también proporciona una célula huésped que se transfecta con el vector mencionado anteriormente. La célula huésped puede ser cualquier célula, una célula procariota o una célula eucariota y puede usarse para producir al menos partes de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo según la presente invención.

También se proporciona mediante la presente invención un método para la producción de un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una célula huésped tal como se describe en el presente documento en condiciones que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico que está compuesta por el vector de ácido nucleico de la invención y recuperar el anticuerpo así producido.

El anticuerpo o fragmento o derivado del mismo según la presente invención puede usarse ventajosamente en una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede aplicarse para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o trastornos, preferiblemente enfermedades autoinmunitarias.

Los anticuerpos específicos para FcγRIIB según la invención inhiben la respuesta inmunitaria en células B, células dendríticas y granulocitos activados (por ejemplo, macrófagos) lo que conduce a una producción reducida de mediadores estimuladores inmunitarios y a una reducción en la producción de anticuerpos así como la presentación de antígenos (por ejemplo, en células dendríticas y macrófagos conduciendo a una disminución en el reclutamiento de células T). Tomados en conjunto se inhibe el bucle de realimentación de producción de anticuerpos y reestimulación del sistema inmunitario.

De manera importante, la unión del anticuerpo anti-FcγRII de la invención al receptor mediante sus regiones variables no interfiere con la unión a fragmento Fc de IC o anticuerpos al receptor, y, a diferencia de anticuerpos de bloqueo conocidos, se mantiene la función normal del receptor de Fc.

Por tanto, en otro aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo según la invención. Dicha composición farmacéutica puede comprender al menos un portador o adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. Pueden proporcionarse anticuerpos en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se conoce en la técnica o tal como se indica en una farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La composición farmacéutica mencionada anteriormente puede usarse para el tratamiento o la profilaxis o el diagnóstico de cualquier enfermedad o trastorno, preferiblemente de enfermedades autoinmunitarias, y lo más preferiblemente de enfermedades autoinmunitarias caracterizadas por la producción de auto-anticuerpos.

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración quedan abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Además, la dosificación y frecuencia de administración variarán normalmente según factores específicos para cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, el tipo de enfermedad, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia clínica anterior del paciente. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes adecuados. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del agente o componente activo terapéutico que es suficiente para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno, para retrasar la aparición de una enfermedad o que proporciona cualquier beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad.

Para anticuerpos abarcados por la invención, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente la dosificación administrada es de aproximadamente 15 mg/kg. Es bien sabido que los anticuerpos humanos tienen una semivida más prolongada dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies. Por tanto, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención o fragmentos o derivados de los mismos puede reducirse en comparación con dosificaciones normalmente usadas de anticuerpos de otras especies.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de anticuerpos o fragmento o derivado de los mismos de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En una realización preferida, un sujeto puede tratarse con anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas. La forma y manera más ventajosas de aplicación pueden elegirse para el mejor beneficio del paciente que va a tratarse. Los métodos de administración de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, los anticuerpos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol. Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" y "tratamiento" se refiere a administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la composición farmacéutica o el anticuerpo que es suficiente para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno, para retrasar la aparición de una enfermedad o para proporcionar cualquier beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, el término "profilaxis" se refiere al uso de un agente para la prevención de la aparición de una enfermedad o trastorno. Una "cantidad profilácticamente eficaz" define una cantidad del componente activo o agente farmacéutico suficiente para prevenir la aparición o recidiva de una enfermedad. Tal como se usan en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a un estado en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica de las propias células, tejidos y/u órganos del sujeto.

Además, pueden usarse anticuerpos de la invención con propósitos de diagnóstico para detectar, diagnosticar o

5 monitorizar enfermedades o trastornos, en particular enfermedades autoinmunitarias. Pueden usarse anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos según la invención para someter a ensayo niveles de Fc γ R1IB en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos tal como se describe en el presente documento o tal como conocen los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985; Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Por tanto, la presente divulgación se refiere además a una composición para diagnóstico que comprende un anticuerpo de la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" se refiere a cualquier uso del anticuerpo de la invención para diagnosticar la presencia de una enfermedad autoinmunitaria relacionada con Fc γ R1IB, por ejemplo la determinación de la cantidad o el grado de la expresión en superficie de Fc γ R1IB endógeno en células de un individuo o paciente. También se refiere a la determinación de la proporción de Fc γ R1I activadores frente a Fc γ R1I inhibidores, por ejemplo la proporción de Fc γ R1IA frente a Fc γ R1IB expresados.

15 En una realización preferida de la divulgación la composición para diagnóstico tal como se describió anteriormente es para la detección y el diagnóstico de cualquier enfermedad o trastorno, especialmente enfermedades autoinmunitarias caracterizadas por la producción de autoanticuerpos. Las enfermedades autoinmunitarias a modo de ejemplo incluyen trombocitopenia inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, pénfigo vulgar y ampolloso, hepatitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa, enfermedad por crioglobulinas, neuropatía periférica autoinmunitaria, pero no se limitan a estas.

25 En un aspecto de la divulgación los anticuerpos de la invención se usan para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en un humano. Por ejemplo, los anticuerpos según la invención pueden usarse para determinar la expresión en superficie de Fc γ R1IB en las células de un individuo que padece una enfermedad autoinmunitaria. Preferiblemente la expresión de Fc γ R1IB en células B o células plasmáticas se detecta usando el anticuerpo en un análisis de FACS. Para ello, el anticuerpo puede modificarse mediante un reactivo marcador, un marcador fluorescente o cualquier otro marcador que el experto en la técnica conoce que es capaz de detectarse usando procedimientos convencionales. El anticuerpo según la invención también puede usarse como herramienta de diagnóstico en combinación con anticuerpos específicos para Fc γ R1IA humano conocidos en el estado de la técnica. Por tanto, puede determinarse la expresión de Fc γ R1IB y Fc γ R1IIB en las células de un individuo que padece una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria y puede calcularse una proporción que es un marcador para el estado patológico o la progresión de la enfermedad o como marcador para el diagnóstico de la enfermedad.

35 La presente divulgación proporciona además un kit de diagnóstico para la detección de enfermedades autoinmunitarias que comprende un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo según la invención, y opcionalmente reactivos marcadores, reactivos portadores y/o receptáculos adecuados y requeridos.

40 **Secuencias**

SEQ ID NO. 1: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de rata 8A6

SEQ ID NO. 2: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de rata 8A6

45 SEQ ID NO. 3: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6

SEQ ID NO. 4: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6

50 SEQ ID NO. 5: Secuencia de aminoácidos de Fc γ R1IB humano

SEQ ID NO. 6: Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6_wt

55 SEQ ID NO. 7: Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6_wt

SEQ ID NO. 8: Secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6

60 SEQ ID NO. 9: Secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6

65 SEQ ID NO. 10: Secuencia de ácido nucleico que codifica para la región constante de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6_wt

ES 2 668 482 T3

- SEQ ID NO. 11: Secuencia de ácido nucleico que codifica para la región constante de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6_wt
- 5 SEQ ID NO. 12: Secuencia de aminoácidos de Fc γ R1IA soluble humano (sFc γ R1IA)
- SEQ ID NO. 13: Secuencia de aminoácidos de Fc γ R1IA soluble humano mutado (sFc γ R1IAmut)
- 10 SEQ ID NO. 14: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de rata 8A6
- SEQ ID NO. 15: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de rata 8A6
- 15 SEQ ID NO. 16: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de rata 8A6
- SEQ ID NO. 17: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de rata 8A6
- 20 SEQ ID NO. 18: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de rata 8A6
- SEQ ID NO. 19: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo de rata 8A6
- 25 SEQ ID NO. 20: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- 30 SEQ ID NO. 21: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- SEQ ID NO. 22: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- 35 SEQ ID NO. 23: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- SEQ ID NO. 24: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- 40 SEQ ID NO. 25: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- 45 SEQ ID NO. 26: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo GB3 (véase también SEQ ID NO. 7 del documento WO 2005/051999)
- SEQ ID NO. 27: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo GB3 (véase también SEQ ID NO. 5 del documento WO 2005/051999)
- 50 SEQ ID NO. 28: Secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada que contiene en la posición 297 una sustitución de N por A (suponiendo que la posición 1 de la secuencia tal como se muestra en la lista de secuencias es la posición 118)
- 55 SEQ ID NO. 29: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- SEQ ID NO. 30: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- 60 SEQ ID NO. 31: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- SEQ ID NO. 32: Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- 65

SEQ ID NO. 33: Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

5 SEQ ID NO. 34: Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácido clave de anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

Breve descripción de las figuras

10 Figura 1: Análisis de resonancia de plasmón superficial de 8A6 humanizado según SEQ ID NO. 3 y 4 bien en formato de tipo natural o bien N297A, ch8A6_N297A (según SEQ ID NO. 14 y 15) y chGB3_N297A.

Figura 2: Secuencias de hu8A6_wt y hu8A6_N297A que representan la posición del intercambio de aminoácido de N por A en formato N297A.

15 Figura 3: Característica no bloqueante de ch8A6_N297A. Se incubaron células Raji con una cantidad establecida de IgG humana agregada y cantidades variables de ch8A6_N297A, chGB3_N297A o anticuerpos bloqueantes 2B6 o Ac de R&D. Los anticuerpos según la invención no son bloqueantes.

20 Figura 4: Unión de 15 µg/ml a 0,005 µg/ml de anticuerpo purificado con proteína A (hu8A6_VL + hu8A6_VH y ch8A6_N297A) a FcγRIIB nativo expresado en células Raji. Las variantes de 8A6 humanizadas se unen con alta avidez a FcγRIIB expresado en células Raji.

25 Figura 5: Unión de 15 µg/ml de anticuerpo (hu8A6_VH + hu8A6_VL y ch8A6_N297A) a FcγRIIA nativo expresado en células K562. Los anticuerpos según la invención no se unen a FcγRIIA en K-562.

30 Figura 6a: Fosforilación de ITIM aumentada por 8A6 quimérico (ch8A6_N297A) en CMSP de donante sano. Se aislaron CMSP de donante sano usando separación de Ficoll y posteriormente se dejaron sin tratar o se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente, se trataron las células o bien durante 20 minutos con ch8A6_N297A 5 µg/ml o bien con tampón como control (w/o). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β-actina = control de carga.

35 Figura 6b: Experimento de control para la fosforilación de ITIM. Se dejaron células de Daudi sin tratar o se trataron durante 25 minutos con un anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo policlonal anti-humano anti-IgM (anticuerpo policlonal anti-hlgM), anticuerpo monoclonal anti-IgM humana (anticuerpo anti-hlgM), anticuerpo anti-hlgM + ch8A6_N297A 5 µg/ml, anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (α-IgG de ratón), α-IgG de ratón + ch8A6_N297A 5 µg/ml, mezcla de anticuerpo anti-hlgM y α-IgG de ratón (mezcla de Ac) o mezcla de Ac + ch8A6_N297A 5 µg/ml. β-actina = control de carga.

40 Figura 6c: Los anticuerpos de la presente invención potencian la fosforilación de ITIM en presencia o ausencia de reticulación/coligación de BCR y RIIB de Fc-gamma en CMSP primarias.

45 Figura 7: Comparación de ch8A6_N297A con anticuerpo del estado de la técnica (chGB3_N297A). Se incubaron células de Daudi humanas durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anticuerpo anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo) o se dejaron sin tratar. Posteriormente o bien se trataron las células durante 20 minutos con cantidades variables de chGB3_N297A o ch8A6_N297A o tampón como control (w/o). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β-actina = control de carga.

50 Figura 8: Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A y chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM en CMSP primarias. Tras la reticulación de BCR y FcγRIIB mediante la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 µg/ml y se llevó a cabo el análisis por inmunotransferencia Western Blot para determinar la fosforilación de ITIM. β-actina = control de carga.

55 Figura 9: Coinmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilado con ITIM de FcγRIIB. Tras la estimulación de células de Daudi con la mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante 2B6 anti-FcγRIIB o chGB3_N297A (5 µg/ml), se precipitó FcγRIIB a partir de lisados celulares y se realizó un análisis por inmunotransferencia Western Blot para la fosfatasa SHIP-1. Anticuerpo anti-CD32 usando pan-anticuerpo anti-CD32 (AF1330) = control de carga.

60 Figura 10: Comparación de variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6-VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7) con ch8A6_N297A. Se dejaron incubar células de Daudi durante 25 minutos con tampón (no tratadas) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente o bien se trataron las células durante 20 minutos con 0,25 µg/ml de ch8A6_N297A o variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6-VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis

65

según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β -actina = control de carga.

Figura 11: Comparación de variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6-VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7) con ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIIB y chGB3_N297A. Se dejaron incubadas células de Daudi durante 25 minutos con tampón (no tratadas) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente o bien se trataron las células durante 20 minutos con 0,25 μ g/ml de ch8A6_N297A, variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6-VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7), anticuerpo bloqueante 2B6 anti-Fc γ RIIB o chGB3_N297A. Se recogieron las células tras la incubación, se sometieron a lisis según el protocolo y se analizaron en un ensayo de inmunotransferencia Western Blot. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β -actina = control de carga.

Figura 12: Configuración experimental para modelo de ratón de PBL de SLE. Se transfieren PBL de pacientes humanos con SLE a ratones inmunocomprometidos. Se injertan células PBL y posteriormente se tratan los ratones con control (PBS) o anticuerpo ch8A6_N297A anti-Fc γ RIIB según la invención.

Figura 13: Nivel de IgG humana total [μ g/ml] en ratones en los que se injertaron PBL de donantes humanos que padecen SLE. Se representan ratones tratados con control (n.º 2, PBS) o ch8A6_N297A (n.º 3 y n.º 4).

Figura 14: Reducción en IgG humana anti-ADN específica de enfermedad en ratones tratados con ch8A6_N297A comenzando en la semana 4 tras la transferencia/injerto de PBL de SLE usando PBL de donantes humanos que padecen SLE. Se representan títulos de IgG anti-ADN en dos ratones diferentes, n.º 3 y n.º 4 (tratados con ch8A6_N297A), n.º 2 muestra el control de PBS.

Ejemplos

PREPARACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 8A6

Se produjo clon de anticuerpo monoclonal 8A6 mediante la inmunización de ratas Long-Evans con receptor Fc γ RIIB humano soluble recombinante. Se produjeron líneas celulares de hibridoma a partir de esplenocitos de rata y se cribaron para seleccionar anticuerpos que se unían específicamente a Fc γ RIIB humano con mayor afinidad que a Fc γ RIIA. En segundo lugar, se cribaron los anticuerpos producidos por los hibridomas anteriormente mencionados para seleccionar características no bloqueantes, es decir estos anticuerpos todavía permiten la unión de IgG o IC a Fc γ RIIB unido a membrana, usando técnicas conocidas en la técnica.

Se inyectaron 50 μ g del Fc γ RIIB humano soluble recombinante purificado (sFc γ RIIB, SEQ ID NO. 5) por vía intraperitoneal (i.p.) y subcutánea (s.c.) en ratas LOU/C usando adyuvante incompleto de Freund complementado con 5 nmol de CpG 2006 (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania). Tras un intervalo de seis semanas se administró un refuerzo final con 50 μ g de sFc γ RIIB y CpG 2006 i.p. y s.c. tres días antes de la fusión. Se realizó la fusión de la línea celular de mieloma con los esplenocitos inmunitarios de rata según procedimientos convencionales. Se sometieron a prueba sobrenadantes de hibridoma en un inmunoensayo en fase sólida con sFc γ RIIB o la proteína sFc γ RIIA irrelevante (SEQ ID NO. 12) recubierta en placas de ELISA. Se detectaron AcM de sobrenadante de cultivo tisular unidos a las proteínas con AcM conjugados con HRP contra los isotipos de IgG de rata (TIB173 anti-IgG2a, TIB174 anti-IgG2b, TIB170 anti-IgG1, todos de ATCC, R-2c anti-IgG2c preparado de manera interna), evitando por tanto AcM de la clase IgM. El AcM 8A6 (IgG2a de rata) reconoció Fc γ RIIB y no se unió a Fc γ RIIA usando el ensayo ELISA específico de antígeno. Se usó un ensayo basado en FACS para cribar los anticuerpos para seleccionar unión específica del antígeno nativo. Adicionalmente, se cribaron los anticuerpos para seleccionar características no bloqueantes, es decir, estos anticuerpos todavía permiten la unión de IgG o complejos inmunitarios a Fc γ RIIB unido a membrana.

Para producir una cantidad suficiente de anticuerpo para la caracterización de los constructos quiméricos y humanizados, se transfectaron de manera transitoria células CHO-S Free-Style™ CHO.

El día antes de la transfección se sembraron células a $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en un medio para obtener una concentración celular final de 20×10^6 células/ml. Para cada transfección se transfirieron 3 ml de la suspensión celular a una placa de 6 pocillos. Se aisló el ADN de plásmido para la transfección usando el kit HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se eluyó en H₂O libre de endotoxinas.

Para cada transfección se añadieron 75 μ g de ADN de plásmido que codificaba para la cadena ligera y 75 μ g de ADN de plásmido que codificaba para la cadena pesada a la suspensión celular y se mezclaron suavemente. A continuación, se añadió PEI (Polyplus) y se mezcló suavemente. Se incubaron las células durante 3 h a 37 °C y CO₂ al 5 % con agitación continua (100 rpm). Se rellenó la suspensión celular con medio hasta un volumen final de 15 ml para lograr una concentración celular final de 4×10^6 células/ml y se transfirió a un matraz de 125 ml. Se incubaron las células a 37 °C y CO₂ al 5 % con agitación continua (100 rpm) y tras 6 d se recogió el sobrenadante

centrifugándolo 2 veces (4000 rpm, 5 min). Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,2 μm y se determinó el título de anticuerpo (véase a continuación).

Se llevó a cabo la determinación del título de anticuerpo mediante dos métodos de HPLC diferentes, HPLC de fase inversa (RP) y proteína A-HPLC. El análisis por RP-HPLC se llevó a cabo con un sistema de HPLC Agilent serie 1200. Se analizaron los datos con el software "Chem Station for LC Systems" rev. B.04.02. Los componentes de disolvente fueron: isopropanol (calidad para HPLC; Roth), acetonitrilo (calidad para gradiente de HPLC; Roth), H_2O (filtrada a través de 0,2 μm) y tetrafluoracetato (TFA) (para síntesis de péptidos; Sigma). Disolvente A: H_2O , el 0,1 % de TFA; disolvente B: el 60 % de isopropanol, el 30 % de acetonitrilo, el 9,9 % de H_2O y el 0,1 % de TFA. Se usó una columna Phenomenex Jupiter (n.º 525166-6) con una porosidad de 300 Å y material de separación con un diámetro de partícula de 5 μm . El anticuerpo unido se eluyó con un gradiente lineal de desde el 30 % hasta el 43 % de disolvente B en el plazo de 10 min. Se produjo la detección a $\lambda = 210 \text{ nm}$ con un detector de UV/VIS.

El análisis por proteína A-HPLC se llevó a cabo con un sistema de HPLC de Agilent serie 1200. Se analizaron los datos con el software "Chemstation" versión rev. B.04.02. Se usaron los siguientes disolventes, disolvente A: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0; disolvente B: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0. Para el análisis, se empaquetó una precolumna analítica Upchurch de 2 x 20 mm con 120 μl de medios de cromatografía de perfusión Applied Biosystems Poros® 20A (Life technologies). El anticuerpo unido se eluyó con el 100 % de disolvente B. En el caso de recoger anticuerpo purificado, se neutralizaron las fracciones con Tris 56 mM pH 8,0.

Se purificaron los anticuerpos expresados con una columna de 1 ml HiTrap™ rProtein A FF (GE Healthcare) mediante cromatografía de líquidos de proteínas rápida (Åkta Explorer). El tampón de migración contenía Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, el tampón de elución estaba compuesto por glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,7. Se neutralizaron los anticuerpos eluidos con Tris-HCl 60 mM pH 8,0, se concentraron, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -80 °C.

CRIBADO DE ANTICUERPOS Y CARACTERIZACIÓN DE 8A6

Se realiza un cribado de sobrenadantes de hibridoma usando técnicas tal como se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo ensayo de unión por ELISA, ensayo Biacore o análisis de unión por FACS. Para someter a prueba la unión específica de antígeno de 8A6 quimérico o las variantes humanizadas, se recubrieron placas de ELISA (placa Nunc-Immuno, F96 Maxisorp) con 1 $\mu\text{g/ml}$ de sFc γ R1IB, sFc γ R1IA (SEQ ID NO. 12) o sFc γ R1IAmut (SEQ ID NO. 13) en PBS (100 $\mu\text{l/pocillo}$) durante la noche a 4 °C. Tras 3 etapas de lavado en Tween al 0,01 % en PBS, se realizó el bloqueo con BSA al 2 % en PBS (300 $\mu\text{l/pocillo}$) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 3 etapas de lavado, se aplicaron diluciones en serie del anticuerpo purificado o sobrenadante (100 $\mu\text{l/pocillo}$) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se diluyeron anticuerpos purificados en PBS, BSA al 2 %. Se complementaron los sobrenadantes con 10 veces PBS y BSA al 20 % para obtener una concentración final de BSA al 2 % en PBS. Como control positivo para Fc γ R1IA se usó el anticuerpo de cabra anti-Fc γ R1IA humano (R&D Systems, AF1875). Tras 3 etapas de lavado en Tween al 0,01 % en PBS, se incubó el anticuerpo secundario respectivo de asno anti-HRP de cabra (F(ab') $_2$, Jackson-Immuno-Research) o de cabra anti-HRP humano (F(ab') $_2$, Dianova) durante 1 hora a temperatura ambiente (100 $\mu\text{l/pocillo}$). Se lavaron los pocillos 6 veces en Tween al 0,01 % en PBS. Se añadió sustrato (OPD que contenía H_2O_2 al 0,03 %) (100 $\mu\text{l/pocillo}$) y se detuvo la reacción con H_2SO_4 4 M (50 $\mu\text{l/pocillo}$). A continuación se midió la absorbancia en un espectrómetro a 492 nm.

Se realizó el análisis de la unión específica al antígeno nativo del 8A6 quimérico o variantes humanizadas mediante unión celular en células de Raji (ATCC® CCL-86™) y K-562 (ATCC® CCL-243™).

Se sedimentaron las células mediante centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1 %, NaN_3 al 0,01 %). Tras una etapa de centrifugación adicional, se resuspendieron las células en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2×10^6 células/ml y se tomó una alícuota de 50 μl de la suspensión celular en una placa de 96 pocillos de fondo en U. Se prepararon diluciones en serie de las variantes humanizadas y ch8A6 en tampón de FACS.

Para verificar la expresión de Fc γ R1IA en células K-562 se diluyó el anticuerpo de ratón anti-CD32 humano (Stem Cell Technologies Inc., clon VI.3) en tampón de FACS. Se añadieron 50 μl de los anticuerpos diluidos a las células y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Se lavaron las células 2 veces en tampón de FACS. A continuación, se diluyeron 50 μl de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con PE (F(ab') $_2$, Dianova) o de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (F(ab') $_2$, Dianova) en tampón de FACS, se añadieron a las células y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Tras 2 etapas de lavado en tampón de FACS, se resuspendieron las células en 300 μl de tampón de FACS y se midieron en BD FACSCanto™ II (Software: BD FACSDiva™).

Para determinar si los anticuerpos contra Fc γ R1IB todavía permiten la unión de IgG o complejos inmunitarios a

Fc γ R1IB unido a membrana se realizó un ensayo basado en FACS. Se sedimentaron las células mediante centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1 %, NaN₃ al 0,01 %). Tras una etapa de centrifugación adicional, se resuspendieron las células en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2 x 10⁶ células/ml. Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos (ch8A6_N297A, chGB3_N297A, Ac de R&D mab1875) en tampón de FACS. Se mezclaron 25 μ l de los anticuerpos diluidos en una placa de 96 pocillos de fondo en U con 25 μ l de Beriglobina agregada marcada con Alexa488 (2,5 μ l/pocillo). Se aisló IgG humana agregada mediante cromatografía de exclusión molecular en un dispositivo Superdex-200 (16/60) a partir de un producto de IgG combinado comercialmente disponible (Beriglobina).

Se añadieron 50 μ l de la suspensión celular a la mezcla de anticuerpo-Beriglobina y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Se lavaron las células 2 veces en tampón de FACS. A continuación, se diluyeron 50 μ l de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con PE (F(ab')₂, Dianova) o anti-rata conjugado con PE en tampón de FACS, se añadieron a las células y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Tras 2 etapas de lavado en tampón de FACS, se resuspendieron las células en 300 μ l de tampón de FACS y se midieron en BD FACSCanto™ II (Software: BD FACSDiva™) (figura 3).

Ensayo de unión por FACS

Se realizó el análisis de la unión específica al antígeno nativo del 8A6 quimérico o variantes humanizadas mediante unión celular en células de Raji y K-562.

Se sedimentaron las células mediante centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1 %, NaN₃ al 0,01 %). Tras una etapa de centrifugación adicional, se resuspendieron las células en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2 x 10⁶ células/ml y se tomó una alícuota de 50 μ l de la suspensión celular en una placa de 96 pocillos de fondo en U. Se prepararon diluciones en serie de las variantes humanizadas y ch8A6 en tampón de FACS.

Se incubaron células de Raji y K562 con concentraciones crecientes de anticuerpos humanizados y el anticuerpo quimérico como control. Se usaron células Raji para someter a prueba la unión en Fc γ R1IB (figura 4), células K562 para analizar la unión no específica a Fc γ R1IA (figura 5). Se detectaron anticuerpos unidos a células con anticuerpo secundario conjugado con PE. Todas las variantes humanizadas se unen a Fc γ R1IB con una afinidad comparable a ch8A6_N297A y todas las variantes humanizadas todavía se unen a Fc γ R1IB con mayor avidéz que a Fc γ R1IA.

Se analizó la unión de anticuerpos a sFc γ R1IB y sFc γ R1IA mediante resonancia de plasmón superficial usando un biosensor Biacore T200 (GE Healthcare / Biacore). Se realizaron experimentos en LMU, Department of Biology and Microbiology, Service Unit Bioanalytic. Se capturaron los anticuerpos analizados en un chip sensor Sensor Chip CM5 series S usando el kit de captura de anticuerpos humanos según el protocolo del fabricante. Se capturaron variantes Hu8A6 o ch8A6 a una concentración de 10 nM durante 1 min. Se inyectó el analito sFc γ R1IB en diversas concentraciones durante 3 min. Se realizaron las mediciones a 25 °C y flujo continuo (10 μ l/min). Se evaluaron los datos usando el software de evaluación Biacore T200 (versión 1.0) suponiendo una unión de 1:1.

QUIMERIZACIÓN DE ANTICUERPO DE RATA 8A6

Se construyó el anticuerpo monoclonal quimérico anti-Fc γ R1IB 8A6 fusionando la región VH de 8A6 de rata con un péptido señal y una región constante de IgG1 humana. Adicionalmente se generó una variante desglicosilada de la cadena pesada usando un dominio constante de IgG1 que contenía una mutación N297A. Para construir el gen de cadena ligera de 8A6, se fusionó igualmente la región VL de 8A6 de rata con una secuencia señal y la secuencia para una región constante kappa humana. Se realizó la síntesis de ADN de cadena pesada y ligera en Genearth/Life Technologies seguido por subclonación en un vector de expresión de mamífero.

ENSAYOS *IN VITRO*

Células, reactivos y anticuerpos

Se adquirieron las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano Daudi y Ramos de DSMZ (ACC 78 y ACC 603) y se mantuvieron en RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Gibco/Invitrogen), MEM NEAA (Gibco/Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM (Gibco/Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Gibco/Invitrogen) a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se purificaron células B humanas primarias a partir de sangre heparinizada de donantes sanos usando gradientes de densidad de Ficoll (Leucosep, Greiner Bio-One, disolución de separación Biocoll, Biochrom) y aislamiento magnético negativo (células B humanas Dynabeads Untouched, Invitrogen). Se estudió la pureza de las células B enriquecidas mediante análisis por FACS mediante tinción con anticuerpo anti-hCD19-APC (BD Pharmingen n.º 555415), anticuerpo anti-hCD3-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences n.º 332771) y anticuerpo anti-hCD56-PE (BD Pharmingen n.º 555515). Se usaron directamente células B primarias para los experimentos sin cultivo adicional. Anticuerpo bloqueante anti-Fc γ R1IB 2B6 según el documento EP1534335.

Protocolo de estimulación usando mezcla de estimulación de anticuerpos solubles

Para la estimulación simultánea de BCR y Fc γ RIIB se estableció un sistema de anticuerpos usando una mezcla de anticuerpos de 2 μ g/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM (Southern Biotech n.º 9022-01, clon UHB) y 20 μ g/ml de anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG(1,2a,3) (Epitomics n.º 3020-1, clon M111-2) de la que la parte Fc reacciona de manera cruzada con el receptor Fc γ RIIB humano. Se realizaron controles con 20 μ g/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-hlgM (antibodies online n.º ABIN117299) o una mezcla que contenía 2 μ g/ml de anticuerpo anti-hlgM y mlgG2b de control de isotipo (clon MPC-11, BD Pharmingen n.º 557351).

Se recogieron 3×10^5 células de las líneas celulares de linfoma Daudi o Ramos y células B primarias mediante centrifugación y se incubaron con las diferentes mezclas de estimulación en medio de ensayo (RPMI 1640 + FBS al 1 %) durante 20 min a 37 °C.

Posteriormente se añadieron 5 μ g/ml de anticuerpos anti-Fc γ RIIB ch8A6 (0,8 μ l de una dilución 1:10), 2B6 (1,5 μ l de una dilución 1:10) o chGB3_N297A (1,1 μ l de una dilución 1:10) a las muestras y se incubaron adicionalmente las células durante 25-30 min. Se realizó la lisis tal como se describe en otra parte.

Análisis por inmunotransferencia Western Blot de patrones de fosforilación

Lisis celular

Se sedimentaron las células a 4 °C, se lavaron con PBS helado y se incubaron en 10 μ l de tampón de lisis (tampón RIPA (Cell Signaling) complementado con inhibidores de fosfatasa (PhosStop, Roche), inhibidores de proteasa (Complete Ultra Mini, libre de EDTA, Roche) y PMSF 1 mM (Fluka Biochemica)) durante 30-45 min en hielo.

SDS-PAGE

Tras la centrifugación, se cargaron los sobrenadantes con tampón de muestra (tampón de muestra NuPAGE LDS, agente reductor de muestra NuPAGE, Invitrogen) aplicado a SDS-PAGE (geles NuPAGE Novex Bis-Tris Mini, tampón de migración MES SDS (Invitrogen)). Para SDS-PAGE, se añadieron tampón de muestra LDS y agente reductor y se calentaron las muestras a 95 °C durante 5 min. Se almacenaron las muestras a -20 °C o se analizaron directamente mediante SDS-PAGE y Western Blot.

Transferencia de proteínas a membranas de PVDF y detección

Posteriormente, se transfirieron proteínas a membranas de PVDF (Roti-PVDF, Roth, tampón de transferencia Tris 10 mM, glicina 100 mM, metanol al 10 %, condiciones de transferencia 240 mA const., 90 min a 4 °C). Se bloquearon las membranas con BSA al 5 % en TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %) y se tiñeron con anticuerpo anti-Fc γ RIIB/CD32 fosfo (pY292) (Cell Epitomics n.º 2308-1, 1:50000, 4 °C durante la noche) o anticuerpo anti-fosfoSHIP (1:1000, Cell Signaling n.º 3941) y anticuerpo anti-HRP de conejo (Jackson ImmunoResearch n.º 111-036-045, 1:50.000 en TBS-T, 1 h a TA). Se detectó la quimioluminiscencia (desarrollada con Western-Lightning Plus, Perkin Elmer) en películas de rayos X.

Separación

Para análisis posteriores con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas fosforiladas, se separaron las membranas (Re-Blot Plus, Millipore) durante 10 min, se lavaron y se bloquearon antes de teñir con anticuerpo anti- β -actina (Sigma-Aldrich n.º A1978, 1:50.000 y anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP, Sigma-Aldrich n.º A9044) o anticuerpos para otras proteínas de señalización.

La fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB en CMSP de donante sano aumentó notablemente mediante anticuerpos de la invención

Se aislaron CMSP de un donante sano y o bien se dejaron sin tratar o bien se incubaron durante 25 minutos con la mezcla de estimulación (anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM y anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG). Posteriormente, se trataron las células o bien con ch8A6 o bien con tampón como control. Se sometieron los lisados celulares a análisis por inmunotransferencia Western Blot usando anticuerpos de detección apropiados tal como se expuso anteriormente. Se detectó un aumento notablemente en la fosforilación del motivo ITIM de Fc γ RIIB de células (CMSP, células B) (figura 6a). Experimentos de control con estimulación de células con mezcla de estimulación sola, o sólo anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM, anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG en combinación con ch8A6 no mostraron una fosforilación aumentada de ITIM de Fc γ RIIB (figura 6b). Por tanto, los anticuerpos de la invención muestran un efecto notablemente en la fosforilación de ITIM de células humanas con BCR y Fc γ RIIB unido a membrana (expresado de manera endógena) reticulados y no en células no estimuladas, es decir células sin BCR y Fc γ RIIB unido a membrana se reticularán mediante auto-antígenos o complejos inmunitarios (IC). Los anticuerpos de

la invención son capaces de inhibir células B autorreactivas patógenas en una enfermedad autoinmunitaria aumentando la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB. Sin embargo, los anticuerpos de la presente invención también son capaces de aumentar la fosforilación de ITIM sin BCR reticulado (figura 6c).

5 Comparación de los efectos de ch8A6 con anticuerpo del estado de la técnica (chGB3_N297A)

Comparación del efecto del clon ch8A6_N297A y el clon chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM. Se trataron células de Daudi humanas con una mezcla de anticuerpos y, posteriormente, ch8A6_N297A, chGB3_N297A o 2B6 tal como se describió anteriormente. El anticuerpo chGB3_N297A al igual que ch8A6_N297A es un anticuerpo no bloqueante anti-Fc γ RIIB y reconoce un epítipo similar.

La adición de ch8A6_N297A a las células tratadas con mezcla de anticuerpos ya mostró un aumento de la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB a una concentración de 0,05 μ g/ml. Aunque concentraciones crecientes de chGB3_N297A mostraron una estimulación dependiente de la dosis de la fosforilación del motivo inhibidor, sorprendentemente este clon de anticuerpo no era capaz de alcanzar niveles de fosforilación comparables a 8A6. La cuantificación densitométrica de la película de rayos X con el software "ImageJ" calculó valores de un máximo de 2,8 veces de las señales de fosfo, mientras que hu8A6_N297A condujo a un aumento de 9,8 veces en comparación con células no tratadas (figura 7). Por tanto, los anticuerpos de la invención muestran de manera clara y sorprendente una fosforilación aumentada de ITIM de Fc γ RIIB en comparación con anticuerpos en el estado de la técnica.

Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6, 8A6_N297A quimérico y chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM en CMSP primarias

Se compararon anticuerpos chGB3_N297A, ch8A6_N297A y 8A6 humanizado en cuanto a su influencia en la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de CMSP humanas primarias. Tras la reticulación de BCR y Fc γ RIIB mediante la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 μ g/ml y se realizó el análisis por inmunotransferencia Western Blot para determinar la fosforilación de ITIM. De nuevo, los anticuerpos de la invención tienen sorprendentemente un efecto notablemente aumentado sobre la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB en comparación con el anticuerpo en el estado de la técnica (figura 8).

30 Coinmunoprecipitación del motivo ITIM de Fc γ RIIB fosforilado y SHIP-1

Tras la reticulación de receptores, se recluta la fosfatasa SHIP en la membrana mediante unión de su dominio SH2 a la fosfo-tirosina en el motivo ITIM de Fc γ RIIB, seguido por fosforilación de tirosina en el motivo NPXY en el dominio C-terminal de SHIP-1. La relocalización en la membrana y posterior fosforilación del motivo NPXY resultan esenciales para la función reguladora de SHIP-1. Su efecto sobre el flujo de calcio, supervivencia celular, crecimiento, parada del ciclo celular y apoptosis está mediado a través de las rutas de PI3K y Akt. Tyr1021 está ubicado en uno de los motivos NPXY en SHIP-1, y su fosforilación es importante para la función de SHIP-1 (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Se estimularon células de Daudi humanas con la mezcla de anticuerpos tal como se definió en la sección anterior y tras la lisis en un tampón de lisis suave (tampón de lisis de CoIP), se incubaron las muestras con 2B6 para la captura de Fc γ RIIB. Se unieron complejos a perlas ferromagnéticas acopladas a proteína G y se aislaron con una gradilla magnética.

Se prepararon lisados de 1×10^7 células/muestra en 500 μ l de tampón de lisis de CoIP, incubando las células durante 30 min en hielo y agitando con vórtex cada 10 min. Se centrifugaron los residuos celulares a 13.000 rpm durante 10 min a 4 $^{\circ}$ C y se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos. Se incubaron 500 μ l de los lisados con 10 μ g de 2B6 durante 2-3 h a 4 $^{\circ}$ C de manera continua. Se lavaron dos veces perlas magnéticas acopladas a proteína G con 500 μ l de tampón de lisis y se añadieron 50 μ l de perlas (1,5 mg) a los complejos lisado-anticuerpo durante la noche a 4 $^{\circ}$ C (agitador rotativo). Se eluyeron los complejos de las perlas lavando dos veces con 200 μ l de tampón de lisis y calentando las perlas durante 5 min en 25 μ l 1x tampón de muestra de LDS que contenía agente reductor. Tras la centrifugación a 4000 x g durante 30 s, se aplicaron 10 μ l del sobrenadante a SDS-PAGE para el análisis por inmunotransferencia Western Blot.

Los análisis por inmunotransferencia Western Blot de los lisados muestran niveles significativamente elevados de fosfo-SHIP-1 en las muestras de células tratadas con mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A. Dado que la precipitación se realizó con el anticuerpo específico de Fc γ RIIB 2B6, sólo se coprecipitó SHIP-1 aislado que se había unido a Fc γ RIIB. Las membranas tras la separación y nueva tinción mostraron una fosforilación potenciada del motivo ITIM de Fc γ RIIB en muestras tratadas con ch8A6_N297A, que se correlaciona con las señales de fosfo-SHIP1. Una segunda nueva tinción con α -hFc γ RIIB a, b, c mostró cantidades iguales del receptor Fc γ RIIB precipitado en todas las muestras, lo que sirve como control de carga para SDS-PAGE (figura 9).

HUMANIZACIÓN DE ch8A6

Se humanizó ch8A6 mediante injerto de las secuencias de región determinante de la complementariedad del anticuerpo de rata en regiones de entramado humanas. Para seleccionar regiones de entramado humanas se compararon las secuencias de V_H y V_L con las de segmentos de línea germinal de región variable y de unión de Ig humana, obtenidos a partir de bases de datos disponibles para el público (IMGT; V-BASE). Se eligieron las secuencias de línea germinal humanas VH_3_30 plus IGJ4 y las secuencias de línea germinal humanas VK3_15 plus IGKJ2 para las cadenas pesada y ligera, respectivamente.

Se generaron varias variantes para las cadenas pesada y ligera humanizadas. Los genes que codificaban para las secuencias diseñadas de V_H y V_L humanizadas se sintetizaron en Life Science Technologies / Geneart, seguido por subclonación en un vector de expresión de mamífero. Se realizó el procedimiento de cribado de las variantes de anticuerpo directamente a partir del sobrenadante de células CHO-S transfectadas (Invitrogen). El anticuerpo 8A6 quimérico sirvió como patrón y control de transfección durante el examen de las variantes humanizadas. Se analizaron variantes de Hu8A6 para determinar la unión en sFc γ RIIB y sFc γ RIIA mediante ELISA y en Fc γ RIIB nativo mediante FACS en células Raji (véase anteriormente). Adicionalmente, se realizó una caracterización cinética de las variantes de anticuerpo con resonancia de plasmón superficial.

Prueba de variantes de 8A6 humanizadas

Para someter a prueba las actividades de fosforilación de variantes de humanización de 8A6, se estimularon células de Daudi con la mezcla de anticuerpos, se trataron con 0,5 o 5 pg/ml de las diversas variantes de 8A6, y se realizó el análisis por inmunotransferencia Western Blot para determinar la fosforilación de ITIM.

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A

Todas las variantes humanizadas de 8A6 sometidas a prueba fueron capaces de inducir fosforilación del receptor y los niveles de fosforilación fueron comparables con los que indujo ch8A6_N297A a partir del mismo lote de purificación. Por tanto, no se detectó ninguna pérdida de actividad tras la segunda ronda de humanización. Aunque los datos de Biacore sugirieron diferentes afinidades para las diferentes combinaciones de cadena pesada y ligera, esas diferencias no pudieron detectarse mediante análisis por inmunotransferencia Western Blot (figura 10).

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIIB (2B6) y chGB3_N297A

Tras elegirse la combinación de cadenas humanizadas definitiva, finalmente se comparó esta variante, que combinaba la cadena pesada V_H10 con la cadena ligera V_L6 , con los anticuerpos ch8A6_N297A, 2B6 y chGB3_N297A (figura 11).

ENSAYOS *IN VIVO*

Modelo de PBL de SLE

Se irradiaron ratones Rag2/gamma-c/Fc γ -/- a una dosificación de 6 Gy y se les inyectaron por vía intraperitoneal diversas cantidades de leucocitos humanos de sangre periférica en 500 μ l de PBS.

Se inició el tratamiento de ratones 2 semanas tras la inyección de células tras verificarse el injerto de PBL de paciente humano con SLE en ratones mediante la presencia de inmunoglobulina M o G humana. Se trataron los ratones con 200 μ l de tampón (PBS) o 20 μ g de anticuerpo (ch8A6_N297A) en 200 μ l de PBS por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas. Se pesaron los ratones y se extrajo sangre para obtener suero una vez por semana. Se congelaron las muestras de suero a -80 °C hasta nuevo uso (figura 12).

ELISA

Se analizaron las muestras de suero mediante ELISA para determinar la presencia de IgM e IgG anti-ADN, IgM e IgG humanas totales.

Para la cuantificación de IgM e IgG en suero totales en muestras de suero, se usaron el kit de cuantificación de ELISA de IgM humana Bethyl y el kit de cuantificación de ELISA de IgG humana (Biomol) según las instrucciones del fabricante. Se midió la DO con un lector de microplacas ajustable VersaMax (Molecular Devices) a 450 y 650 nm.

Para la detección de anticuerpos anti-ADN, se recubrieron las placas de ELISA con BSA metilado 10 μ g/ml (Sigma) en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar, se recubrieron las placas con ADN de timo de ternero 50 μ g/ml (Sigma) en PBS a 4 °C durante la noche. Se realizó el bloqueo de la unión no específica con PBS/gelatina al 0,1 %/BSA al 3 %/EDTA 1 mM durante 2 h a temperatura ambiente. Se diluyeron los sueros 1:100 en la disolución de bloqueo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Como anticuerpo de detección, se usó el anticuerpo

conjugado con HRP del kit de cuantificación de IgM humana (Bethyl) y se diluyó 1:10.000 en disolución de bloqueo seguido por incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Se usó PBS para todas las etapas de lavado. Para la detección, se añadió disolución de TMB y se detuvo la reacción con ácido ortofosfórico al 6 %.

5 Modelo de PBL de SLE, inmunoglobulina humana total en suero

Se analizaron los niveles de IgG humana total [$\mu\text{g/ml}$] en ratones en los que se injertaron PBL de donantes humanos que padecían SLE. No se detectó ninguna diferencia significativa en la IgG humana total entre PBS o anticuerpo anti-Fc γ R1IB. El anticuerpo según la invención no influye significativamente en la IgG humana total (figura 13).

10

Modelo de PBL de SLE, influencia en anticuerpos anti-ADN (IgG específica de enfermedad)

Se observó una reducción notable en la IgG anti-ADN humana específica de enfermedad en ratones con anticuerpo anti-Fc γ R1IB comenzando en la semana 4 tras la transferencia/injerto de PBL de SLE. Los anticuerpos de la invención reducen específicamente la cantidad de anticuerpos anti-ADN relevantes para la enfermedad (figura 14).

15

Bibliografía

Almagro J.C. y Fransson J. (2008), Humanization of antibodies. *Front Biosci* 13:1619-33.

20

Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., Fridman, W.H. (1992), Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes, *Science* 256, 1808-1812.

25

Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. 2010. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 345-352.

Bolland S, Ravetch JV (2000), Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)R1IB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13(2), 277-85.

30

Cassel DL, Keller MA, Surrey S, Schwartz E, Schreiber AD, Rappaport EF, McKenzie SE Differential expression of Fc gamma R1IA, Fc gamma R1IB and Fc gamma R1IC in hematopoietic cells: analysis of transcripts. *Mol Immunol.* abril de 1993; 30(5):451-60.

35

Chan AC y Carter PJ. 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation *Nat. Rev., Immunol.* 10(5):301-16.

Daeron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S, Fridman WH. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma R1IB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcRdependent cell activation. *Immunity* 3:635-46.

40

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 63(1):78-85.

45

Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. & Fleit, H.B. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc γ R1I and monocytic THP-1 cells, *J.Biol. Chem.* 269, 8878-8884 (1994)

Hammerling *et al.* *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas*, págs. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)

50

Harlow *et al.* (2nd Ed. 1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Isakov N. (1997), ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res.* 16, 85-100.

55

Jones, P.T. *et al.* (1968), Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321:522-525.

Malmberg AC, Borrebaeck CA. (1995) BIAcore as a tool in antibody engineering. *J Immunol Methods.* 14 de junio de 1995; 183(1):7-13.

60

Nimmerjahn F, Ravetch JV 2008. Fc receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34-47.

Presta L.G. (2008), Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol.* 20(4):460-70.

65

Ravetch, J. V. y Bolland, S. (2001), IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.

Reichert JM. (2012) Marketed therapeutic antibodies compendium. MAbs 4(3):413-5

5 Santos A.D. y Padlan E.A. (1998), Development of more efficacious antibodies for medical therapy and diagnosis. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 60:169-94.

Winter G, Milstein C. (1991) Man-made antibodies. Nature. 349(6307):293-9.

10 Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KG. 2007. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. Nat Immunol. 8(4):419-29.

15 Zhou, M.-J., Todd, R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R. (1993), Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with FcγRIII on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions, J. Immunol. 150, 3030-3041.

Lista de secuencias

<110> SuppreMol GmbH
 20 <120> Nuevos anticuerpos anti-receptor IIB de FC-gamma y usos de los mismos
 <130> Documento 02043198PCT
 <150> Documento EP13004094.2
 <151> 16-08-2013
 25 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 113
 30 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (1)..(113)
 <223> VH r8A6
 <400> 1

ES 2 668 482 T3

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

Ser

<210> 2
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> VL r8A6
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(108)
 15 <223> VL r8A6
 <400> 2

ES 2 668 482 T3

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

Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr
20 25 30

Val Asp Trp Phe Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Asn Met Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Tyr His Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 113
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> anticuerpo humanizado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
15 <223> VH hu8A6

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val

ES 2 668 482 T3

50

55

60

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

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

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 4
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> anticuerpo humanizado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(108)
15 <223> VL hu8A6

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Asn His Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

20 <210> 5
<211> 181
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(181)

ES 2 668 482 T3

<223> FcγRIIB humano

<400> 5

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
20 25 30

Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro
180

5

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo humanizado

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(329)

<223> CH hu8A6_wt

20 <400> 6

ES 2 668 482 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

ES 2 668 482 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 7
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> anticuerpo humanizado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
15 <223> CL hu8A6_wt

<400> 7

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

20 <210> 8
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>

<223> anticuerpo humanizado

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(339)
 <223> VH hu8A6

<400> 8

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatcc atatcatacg atggaagcaa taagtactac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaccggga 300
 10 gactactggg gccaaaggaac cctggtcacc gtcagctca 339

<210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo humanizado

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(324)
 <223> VL hu8A6

25 <400> 9

cagatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gtccgttggc tcctatgtcg actggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca ggtacactgg tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtctgcag tataacaacc atccttacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

<210> 10
 <211> 990
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo humanizado

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(990)
 40 <223> CH hu8A6_wt

<400> 10

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ES 2 668 482 T3

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggttgagccc 300
 aaatcttgty acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtggg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggttaa 990

5 <210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> anticuerpo humanizado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(321)
 <223> CL hu8A6_wt

15 <400> 11

acgggtggctg caccatcggg cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

20 <210> 12
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(125)

ES 2 668 482 T3

<223> FC γ RIIA hu soluble

<400> 12

Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr
1 5 10 15

Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu
20 25 30

Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr
35 40 45

Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val
50 55 60

Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro
65 70 75 80

Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His
85 90 95

Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr
100 105 110

5 Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro
115 120 125

<210> 13

<211> 179

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(179)

15 <223> FC γ RIIA humano mutado soluble

<400> 13

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp Ile Asn
1 5 10 15

Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala Arg Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro
35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser
50 55 60

ES 2 668 482 T3

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu
85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
130 135 140

Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
145 150 155 160

Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Met Gly
165 170 175

Ser Ser Pro

<210> 14
<211> 5
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> CDR1 de cadena pesada de anticuerpo de rata 8A6
<400> 14

Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

15 <210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> CDR2 de cadena pesada de anticuerpo de rata 8A6
<400> 15

Ser Ile Ser Ser Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

25 Gly

<210> 16
<211> 6
30 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada de anticuerpo de rata 8A6

<400> 16

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr
1 5

5

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> CDR1 de cadena ligera de anticuerpo de rata 8A6

<400> 17

15

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr Val Asp
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

20

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera de anticuerpo de rata 8A6

25

<400> 18

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

30

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

35

<220>
<223> CDR3 de cadena ligera de anticuerpo de rata 8A6

<400> 19

Leu Gln Tyr Asn Tyr His Pro Tyr Thr
1 5

40

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

45

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada de anticuerpo 8A6 humanizado

50

<400> 20

Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

55

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

60

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada de anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 21

ser Ile ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 22

15

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de anticuerpo 8A6 humanizado

25

<400> 23

Arg Ala Ser Gln ser Val Gly Ser Tyr Val Asp
 1 5 10

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de anticuerpo 8A6 humanizado

35

<400> 24

Gly Ala Ser Thr Arg Tyr Thr
 1 5

40

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

45

<220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de anticuerpo 8A6 humanizado

50

Leu Gln Tyr Asn Asn His Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> artificial

55

<220>

<223> región variable de la cadena pesada del anticuerpo GB3

5 <400> 26

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

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

Ile Tyr Trp Val Lys Gln Trp Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Trp Ile Phe Pro Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
50 55 60

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

Leu Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Tyr
85 90 95

Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 27

10 <211> 104

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> región variable de la cadena pesada del anticuerpo GB3

<400> 27

Arg Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100

20

ES 2 668 482 T3

<210> 28
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> región constante de cadena pesada de IgG con cambio de N por A en la posición 297 cuando se considera la pos. 1 como pos. 118

10 <400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

ES 2 668 482 T3

	180		185		190														
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn			
			195					200					205						
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly			
		210					215					220							
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu			
	225					230					235					240			
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr			
				245						250					255				
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn			
				260					265					270					
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe			
			275					280					285						
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn			
		290					295					300							
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr			
	305					310					315					320			
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly										
					325														

- <210> 29
- <211> 5
- 5 <212> PRT
- <213> artificial

- <220>
- 10 <223> CDR1 de región variable de cadena pesada

- <220>
- <221> misc
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 15

- <220>
- <221> misc
- <222> (1) .. (1)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 20

- <220>
- <221> misc
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 25

- <220>
- <221> misc
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 30

- <220>

<221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5 <400> 29

Xaa Xaa Xaa Met Ala
1 5

<210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena pesada

<220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20

<220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25

<220>
 <221> misc
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

30

<220>
 <221> misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can K o T

35

<220>
 <221> misc
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40

<220>
 <221> misc
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

45

<220>
 <221> misc
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

50

<220>
 <221> misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

55

<220>
 <221> misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

60

<400> 30

Ser Xaa Ser Tyr Asp Gly Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Ser Val Xaa

1

5

10

15

Xaa

5 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> CDR3 de región variable de cadena pesada

15 <220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <220>
 <221> misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

30 <220>
 <221> misc
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

35 <220>
 <221> misc
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 31

Ala Arg Xaa Gly Xaa Xaa
 1 5

40 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> CDR1 de región variable de cadena ligera

50 <220>
 <221> misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

55 <220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

60 <220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 <222> (4)..(4)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 <222> (5)..(5)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 <222> (8)..(8)
 20 <223> Xaa puede ser S o T

<220>
 <221> misc
 <222> (9)..(9)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 32

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Asp
1 5 10

30 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> CDR2 de región variable de cadena ligera

40 <220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

45 <220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

50 <220>
 <221> misc
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser T o N

<400> 33

55 **Gly Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Thr**
1 5

60 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

<223> CDR3 de región variable de cadena ligera

<220>
 <221> misc
 5 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 10 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 15 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 20 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 25 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 30 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 35 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 40 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 45 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 34

50 Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Xaa Xaa Xaa
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-Fc γ RIIB que comprende
- 5 (i) una secuencia de H-CDR1 que es idéntica en el 60 % o más a la secuencia de H-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 20,
- (ii) una secuencia de H-CDR2 que es idéntica en el 36 % o más a la secuencia de H-CDR2 mostrada en
- 10 SEQ ID NO. 21,
- (iii) una secuencia de H-CDR3 que es idéntica en el 50 % o más a la secuencia de H-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 22,
- (iv) una secuencia de L-CDR1 que es idéntica en el 64 % o más a la secuencia de L-CDR1 mostrada en
- 15 SEQ ID NO. 23,
- (v) una secuencia de L-CDR2 que es idéntica en el 29 % o más a la secuencia de L-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 24, y
- 20 (vi) una secuencia de L-CDR3 que es idéntica en el 78 % o más a la secuencia de L-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 25,
- en el que dicho anticuerpo, usado a una concentración de entre 5 μ g/ml y 50 μ g/ml, aumenta la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.
- 25
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 29, 30 y 31 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 32, 33 y 34, en el que dicho anticuerpo
- 30 aumenta la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.
3. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que
- 35 (a) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra en las SEQ ID NO. 14, 15 y 16 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 17, 18 y 19; o
- (b) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestra
- 40 en las SEQ ID NO. 20, 21 y 22 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en las SEQ ID NO. 23, 24 y 25,
- en el que dicho anticuerpo aumenta la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células de Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con células de Daudi no tratadas con dicho anticuerpo.
- 45
4. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es quimérico o humanizado.
5. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 3, con al menos una de las
- 50 mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por E, el aminoácido V en la posición 11 se reemplaza por L, el aminoácido G en la posición 42 se reemplaza por K, el aminoácido S en la posición 50 se reemplaza por V, el aminoácido Y en la posición 53 se reemplaza por S, el aminoácido K en la posición 58 se reemplaza por T, el aminoácido G en la posición 61 se reemplaza por A, el aminoácido S en la posición 75 se reemplaza por T, el aminoácido K en la
- 55 posición 76 se reemplaza por R, el aminoácido N en la posición 77 se reemplaza por S y el aminoácido T en la posición 78 se reemplaza por N, y/o en el que la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 4, con al menos una de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 28 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 31 se reemplaza por T, el aminoácido V en la posición 33 se reemplaza por L, el aminoácido D en la posición 34 se reemplaza por A, el aminoácido Y en la posición 49 se reemplaza por F, el aminoácido T en la posición 53 se reemplaza por N, el aminoácido Y en la posición 55 se reemplaza por A, el aminoácido L en la posición 89 se reemplaza por Q y el aminoácido N en la posición 93 se reemplaza por Y.
- 60
- 65 6. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la región variable de

cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 o 3; y/o la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2 o 4.

- 5 7. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une específicamente a los aminoácidos n.º 20-40 de Fc γ RIIB humano según SEQ ID NO. 5.
- 10 8. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une *in vitro* a Fc γ RIIB humano con una afinidad que tiene una constante de velocidad de disociación de al menos $4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial.
- 15 9. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende en su región constante de cadena pesada la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6; y/o en su región constante de cadena ligera la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7.
- 20 10. Anticuerpo anti-Fc γ RIIB que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 o 3 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2 o 4; y que comprende opcionalmente en su región constante de cadena pesada la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6; y en su región constante de cadena ligera la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7.
- 25 11. Secuencia de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 30 12. Vector de ácido nucleico que comprende al menos una de las secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 11 insertada en una molécula de vector.
- 35 13. Célula huésped transfectada con un vector de ácido nucleico según la reivindicación 12.
- 40 14. Composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad autoinmunitaria, estando dicha enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la producción de autoanticuerpos; y/o para su uso en un método de tratamiento o profilaxis de trombocitopenia inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, pénfigo vulgar y ampoloso, hepatitis autoinmunitaria, colitis ulcerosa, enfermedad por crioaglutininas y neuropatía periférica autoinmunitaria.
16. Método para la producción de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 13 en condiciones que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico que está compuesta por el vector de ácido nucleico según la reivindicación 12 y recuperar el anticuerpo así producido.

Análisis de SPR de variantes 8A6 WT humanizada y N297A, GB3 WT y ch8A6 WT

	k_{off} [s^{-1}]
hu8A6_wt	9.5×10^{-4}
hu8A6_N297A	8.8×10^{-4}
ch8A6_wt	4.9×10^{-4}
chGB3_N297A	1×10^{-2}

Figura 1

Figura 1: Análisis de resonancia de plasmón superficial de 8A6 humanizado (hu8A6_VH10+VL6) según SEQ ID NO. 3 y 4 en formato o bien de tipo natural o bien N297A, ch8A6_WT (según SEQ ID NO. 1 y 2) y chGB3_N297A.

Figura 2**Secuencia de hu8A6_wt y hu8A6-N297A**

Los aminoácidos de las regiones variables se numeran simplemente de manera independiente de cualquier sistema de numeración. Para una mejor comprensión de los cambios de aminoácidos en el dominio de Fc se eligió la numeración de EU

Cadena pesada / 8A6_wt humanizado (glicosilado)

Dominio de VH (variante VH10)

```
1  QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYMAWVRQA PGKGLEWVAS ISYDGSNKYY
61 GDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARPG DYWGQGLVT VSS (SEQ ID
NO. 3)
```

Dominio de Fc (N297 glicosilado / alotipo G1m17 que contiene K214; E356; A431 / sin Lys C-terminal; según la numeración de EU)

```
118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
298 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 6)
```

Cadena pesada / 8A6_N297A humanizado (desglicosilado)

Dominio de VH, véase anteriormente

Dominio de Fc (variante N297A / alotipo G1m17 que contiene K214; E356; M358; A431 / sin Lys C-terminal; según la numeración de EU)

```
118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYA
298 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 28)
```

Figura 2: Secuencias de variantes hu8A6_wt y hu8A6_N297A que muestran la posición de la modificación de aminoácido de N por A en formato N297A.

Análisis por FACS que muestra características no bloqueantes de ch8A6_N297A

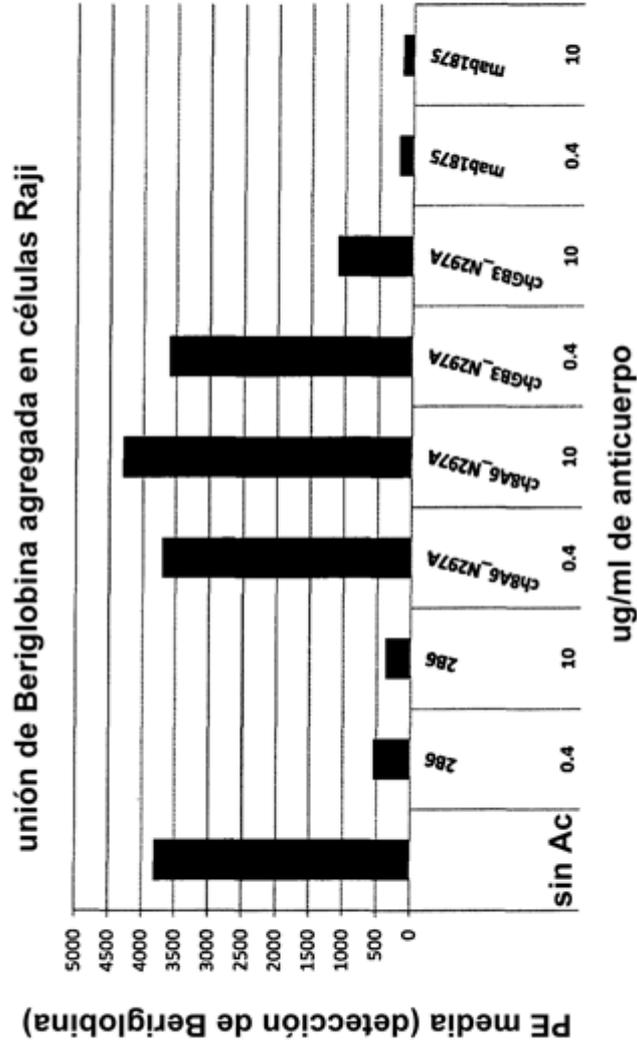


Figura 3

Figura 3: Característica no bloqueante de ch8A6_N297A. Se incubaron células Raji con una cantidad establecida de IgG humana agregada y cantidades variables de ch8A6_N297A, ch8B3_N297A o anticuerpos bloqueantes 2B6 o mab1875 (R&D). Los anticuerpos según la invención no son bloqueantes.

Análisis por FACS de la especificidad de unión de variantes de 8A6 humanizadas

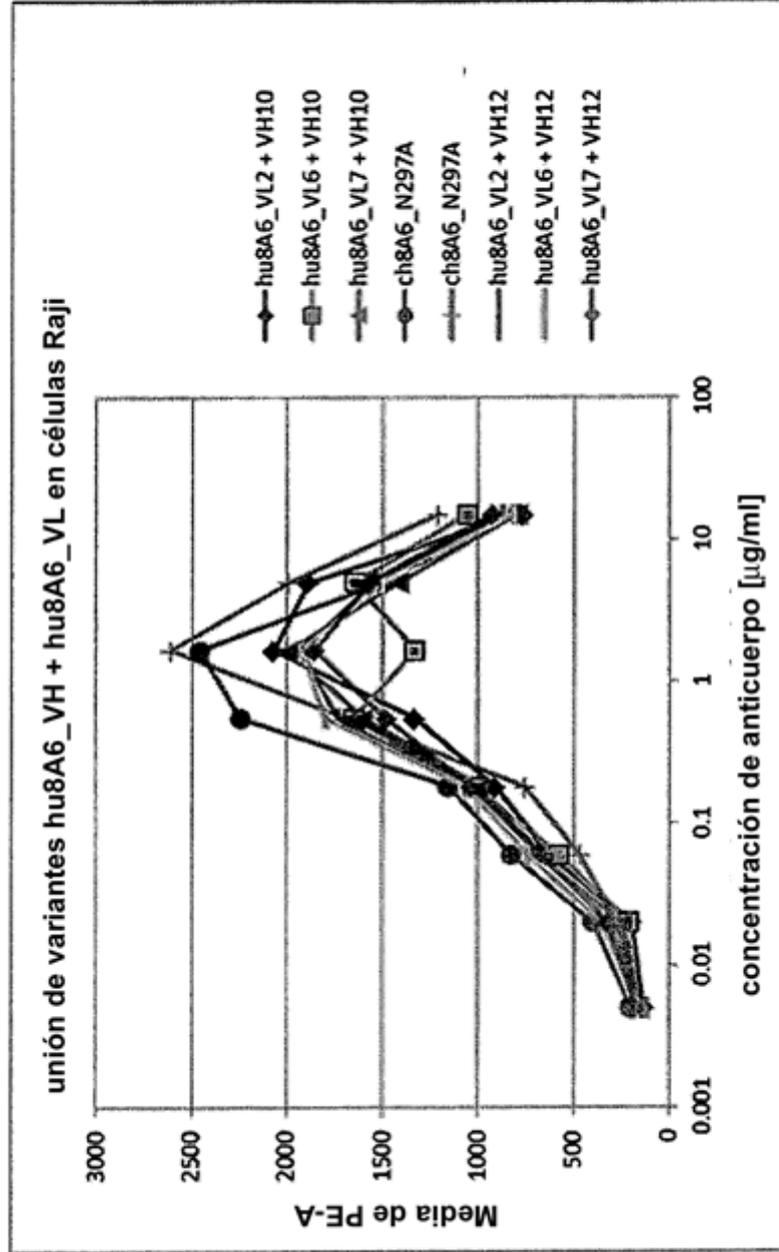


Figura 4

Figura 4: Unión de 15 µg/ml a 0,005 µg/ml de anticuerpo purificado con proteína A (hu8A6_VL + hu8A6_VH y ch8A6_N297A) a Fc γ R1IB nativo expresado en células Raji. Las variantes de 8A6 humanizadas se unen con alta avidéz a Fc R1IB expresado en células Raji.

Análisis por FACS de la especificidad de unión de variantes de 8A6 humanizadas

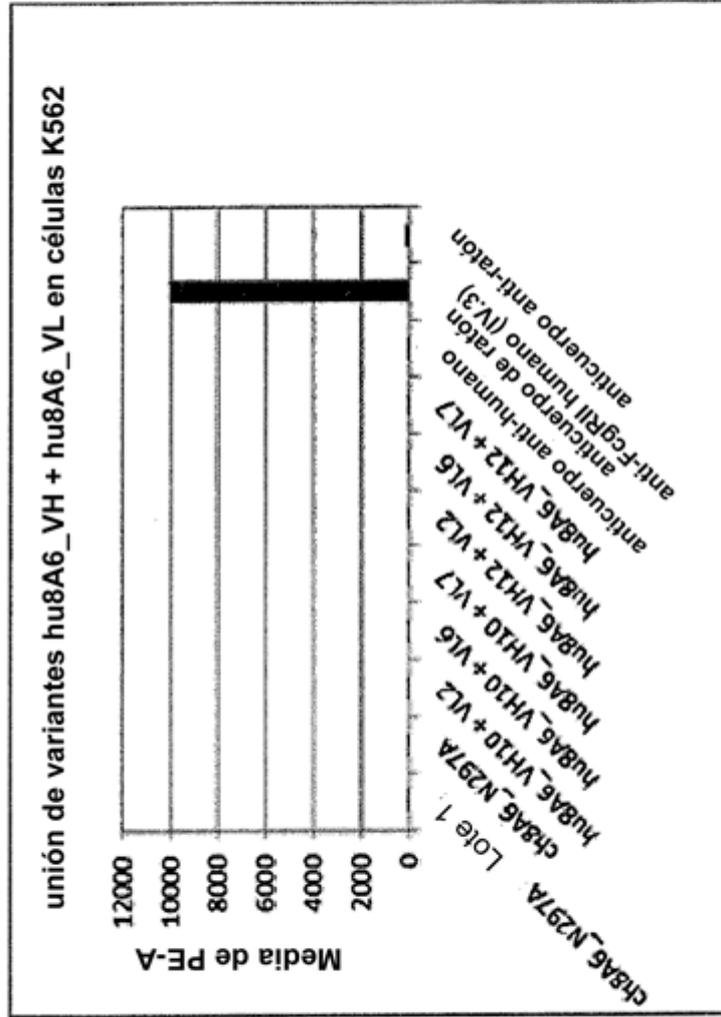


Figura 5

Figura 5: Unión de 15 µg/ml de anticuerpo purificado con proteína A (hu8A6_VH + hu8A6_VL y ch8A6_N297A) y ch8A6_N297A a FcγRIIA nativo expresado en células K562. Los anticuerpos según la invención no se unen a FcγRIIA en K-562.

Fosforilación de ITIM aumentada por ch8A6 en CMSP de donante sano

Figura 6a: Ensayo de fosforilación de ITIM. Se aislaron CMSP de donante sano usando separación de Ficoll y posteriormente se dejaron sin tratar o se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente, se trataron las células o bien 20 minutos con ch8A6_N297A 5 µg/ml o bien con tampón como control (w/o). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β-actina = control de carga.

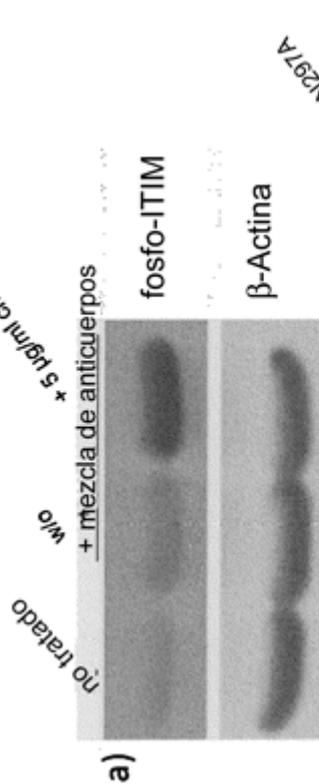


Figura 6b: Ensayo de fosforilación de ITIM. Se dejaron células de Daudi sin tratar o se trataron durante 25 minutos con un anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo policlonal anti-humano anti-IgM (anticuerpo policlonal anti-hlgM), anticuerpo monoclonal anti-IgM humana (anticuerpo anti-hlgM), anticuerpo anti-hlgM + ch8A6_N297A 5 µg/ml, anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (α-IgG de ratón), α-IgG de ratón + ch8A6 5 µg/ml, mezcla de anticuerpo anti-hlgM y α-IgG de ratón (mezcla de Ac) o mezcla de Ac + ch8A6_N297A 5 µg/ml. β-actina = control de carga.

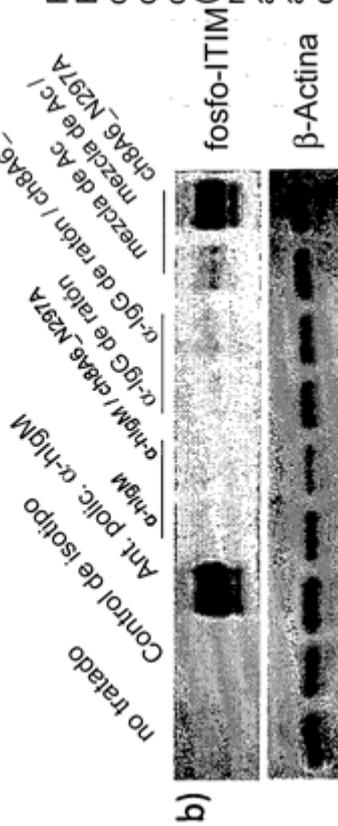
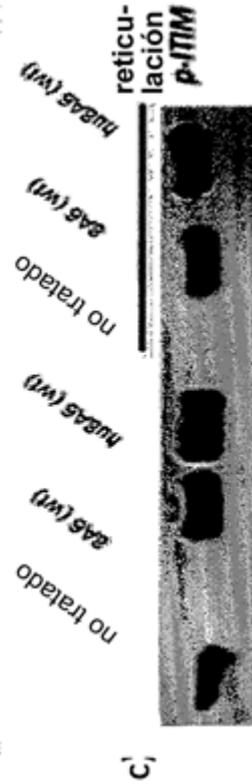


Figura 6c: Así como hu8A6 mostraron una fuerte fosforilación de RIB de FcγRIIB sin necesidad de coligación previa de BCR y FcγRIIB. Tras la reticulación de los receptores por la mezcla de anticuerpos, hu8A6 (wt) y hu8A6 fueron capaces (como se esperaba) de inducir fosforilación de ITIM



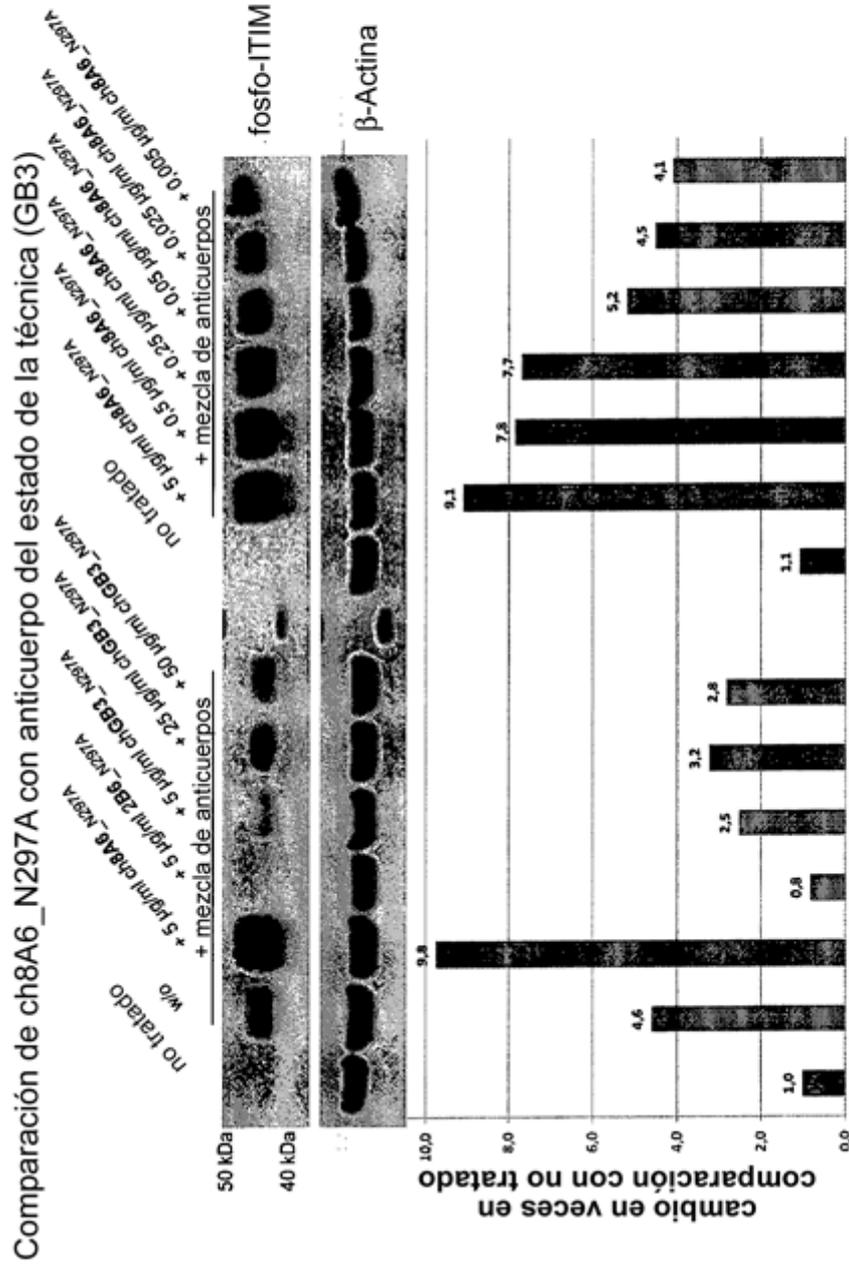


Figura 7

Figura 7: Ensayo de fosforilación de ITIM. O bien se dejaron sin tratar células de Daudi o bien se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anticuerpo anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente o bien se trataron las células 20 minutos con cantidades variables de chGB3_N297A o ch8A6_N297A o tampón como control (w/o). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β-actina = control de carga.

Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A sobre la fosforilación de ITIM en CMSP primarias

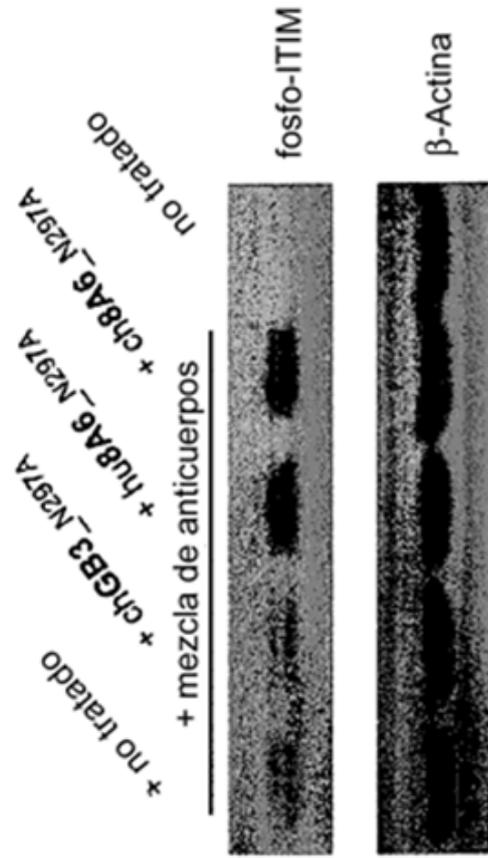


Figura 8

Figura 8: Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A sobre la fosforilación de ITIM en CMSP primarias. Tras la reticulación de BCR y FcγR1B mediante la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 µg/ml y se llevó a cabo el análisis por inmunotransferencia Western Blot para determinar la fosforilación de ITIM. β-actina = control de carga.

Coinmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilado con Fc γ R1IB.

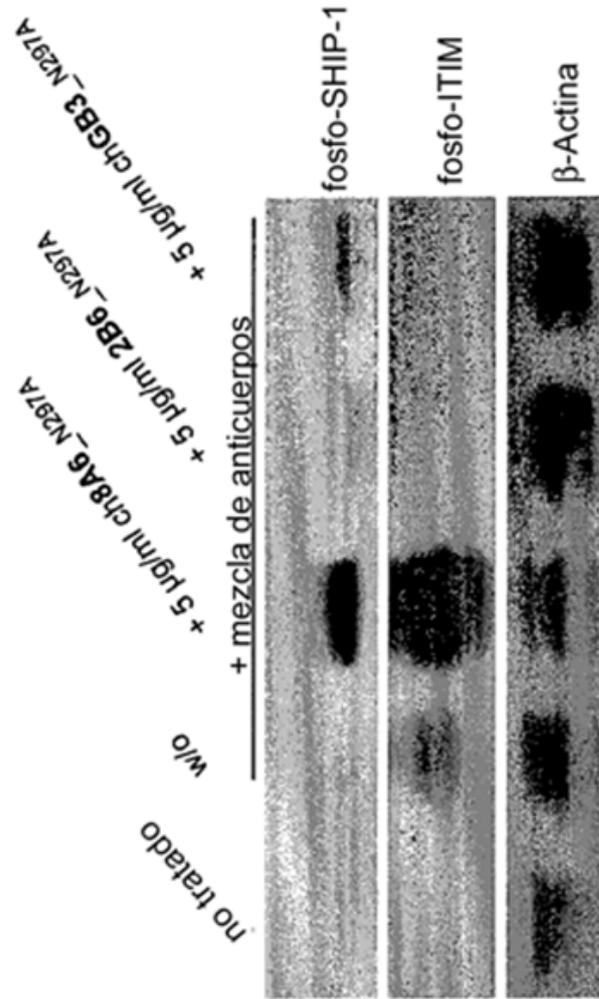


Figura 9

Figura 9: Coinmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilado con ITIM de Fc γ R1IB. Tras la estimulación de células de Daudi con la mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante 2B6 anti-Fc γ R1IB o chGB3_N297A (5 µg/ml), se precipitó Fc γ R1IB a partir de lisados celulares y se realizó un análisis por inmunotransferencia Western Blot para la fosfatasa SHIP-1. Anticuerpo anti-CD32 (AF1330) = control de carga.

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A

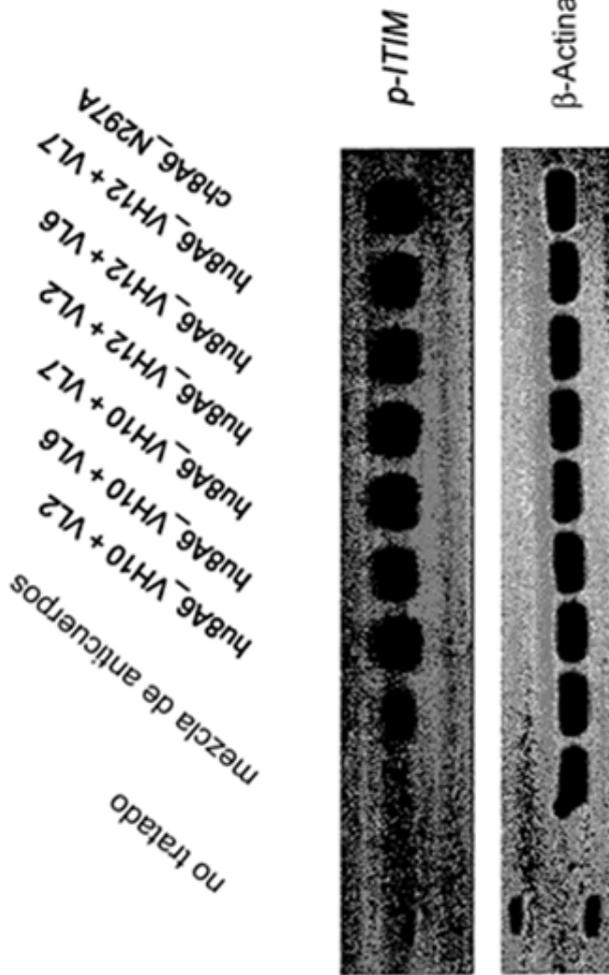


Figura 10

Figura 10: Ensayo de fosforilación de ITIM. Se dejaron incubar células de Daudi durante 25 minutos con tampón (no tratadas) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente o bien se trataron las células durante 20 minutos con 0,25 µg/ml de ch8A6_N297A o variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7). Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por WB. β-actina = control de carga.

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A, 2B6 y chGB3_N297A

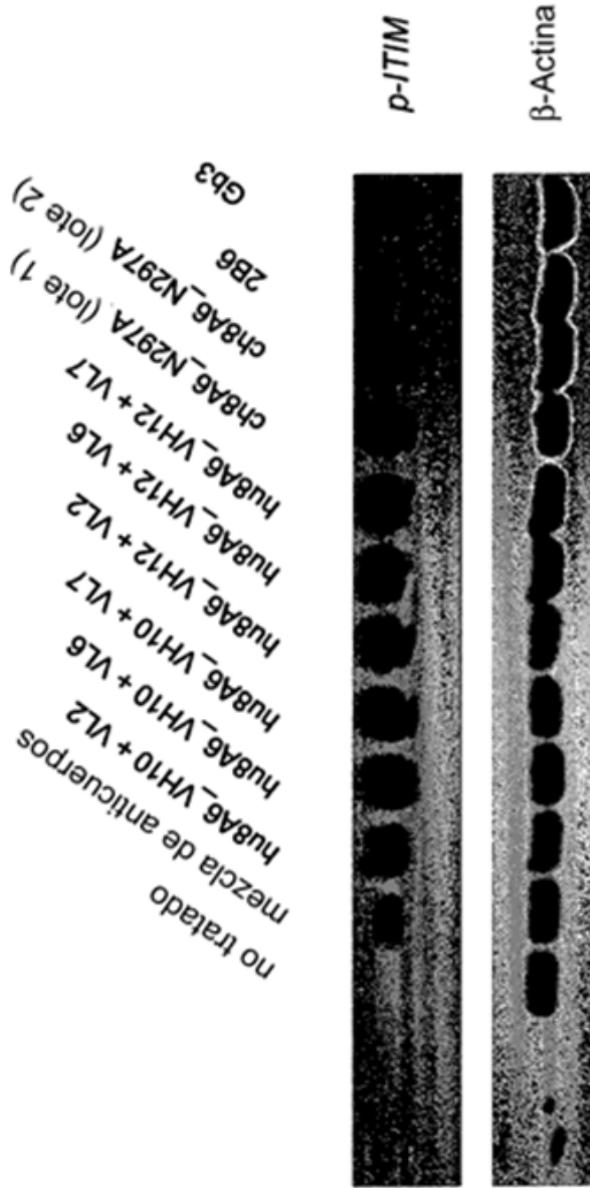


Figura 11

Figura 11: Ensayo de fosforilación de ITIM. Se dejaron incubar células de Daudi durante 25 minutos con tampón (no tratadas) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, de ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (de conejo). Posteriormente o bien se trataron las células 20 minutos con 0.25 µg/ml de ch8A6_N297A, variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2/VH10 + VL6/VH10 + VL7/VH12 + VL2/VH12 + VL6/VH12 + VL7), anticuerpo bloqueante 2B6 o chGB3_N297A. Se recogieron las células tras la incubación y se sometieron a lisis según el protocolo. Se sometieron los lisados a análisis por Western Blot. β-actina = control de carga.

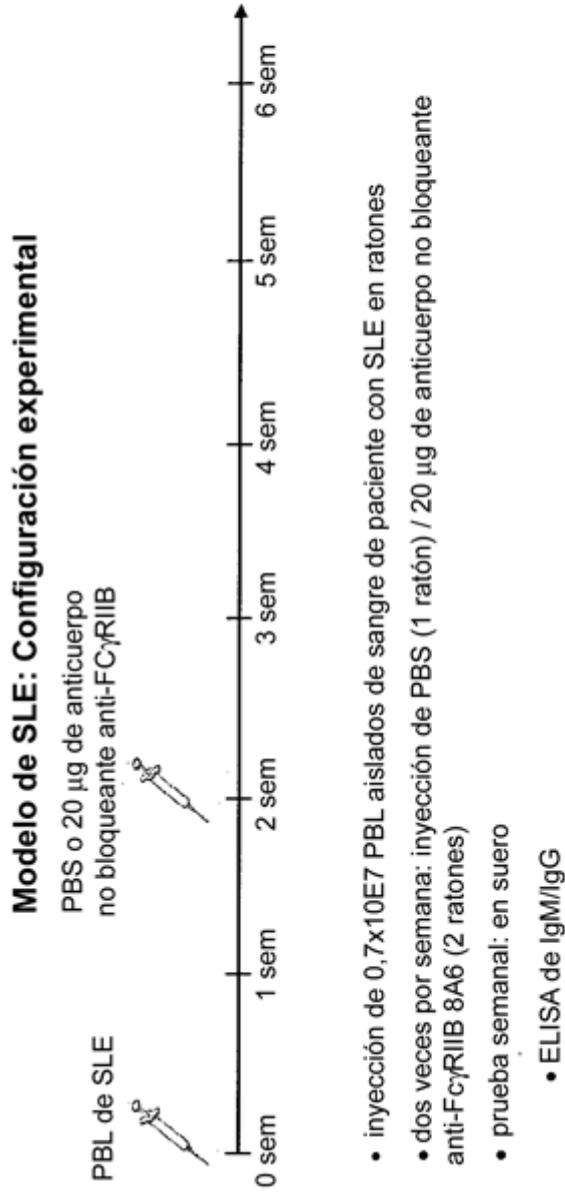


Figura 12

Figura 12: Configuración experimental para modelo de ratón de PBL de SLE. Se transfieren PBL de pacientes humanos con SLE a ratones inmunocomprometidos. Se injertan células PBL y posteriormente se tratan los ratones con control (PBS) o anticuerpo ch8A6_N297A anti-FcγRIIB según la invención.

Modelo de PBL de SLE, inmunoglobulina humana total en suero

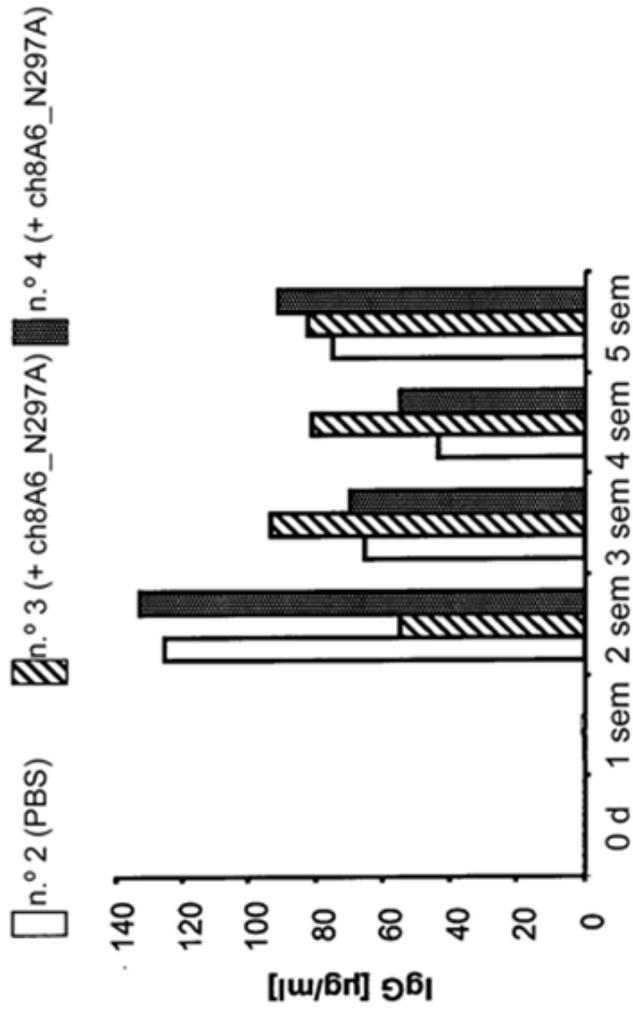


Figura 13

Semanas tras la transferencia de PBL

Figura 13:

Nivel de IgG humana total [µg/ml] en ratones en los que se injertaron PBL de donantes humanos que padecen SLE. Se representan ratones tratados con control (n.º 2, PBS) o 8A6 quimérico = ch8A6_N297A (n.º 3 y n.º 4, anticuerpo anti-FcγRIIB, formato N297A). Sin diferencias significativas en la IgG humana total entre PBS o anticuerpo anti-FcγRIIB.

Modelo de PBL de SLE, influencia de anticuerpos anti-ADN (IgG específica de enfermedad)

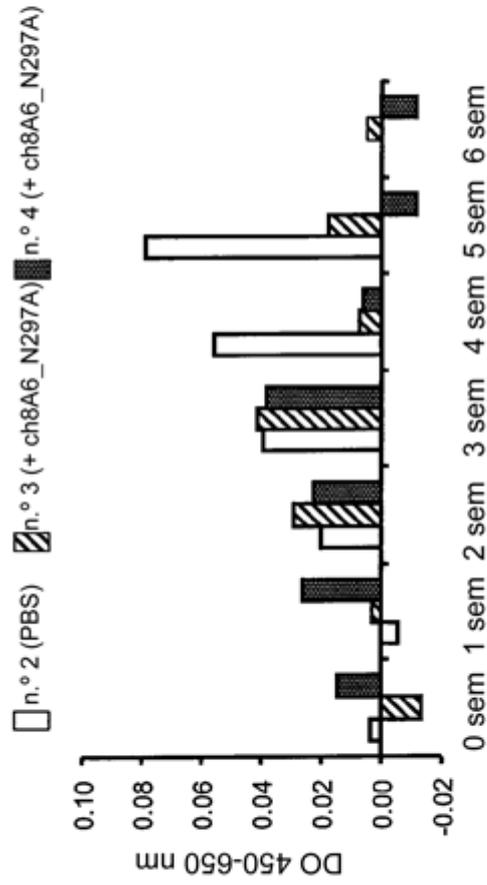


Figura 14

Semanas tras la transferencia de PBL

Figura 14:
Reducción en IgG humana anti-ADN específica de enfermedad en ratones tratados con ch8A6_N297A comenzando en la semana 4 tras la transferencia/injerto de PBL de SLE. Se representan títulos de IgG anti-ADN en dos ratones diferentes, n.º 3 y n.º 4 (tratados con ch8A6_N297A), n.º 2 muestra el control de PBS.