

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 087**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2008 PCT/US2008/066957**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008 WO08157379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08771050 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2158221**

54 Título: **Diacuerpos covalentes y sus usos**

30 Prioridad:

21.06.2007 US 945523 P

04.01.2008 US 19051 P

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

27.02.2019

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)

9704 Medical Center Drive

Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE, S. y

HUANG, LING

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 702 087 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

Diacuerpos covalentes y sus usos

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se dirige a moléculas de diacuerpo y a los usos de las mismas en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo trastornos inmunológicos y cánceres. Las moléculas de diacuerpo de la invención comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión al epítipo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes. Además, los epítopos pueden ser de las mismas moléculas o de moléculas diferentes, o estar ubicados en las mismas células o en células diferentes. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente mediante enlaces covalentes que no sean enlaces peptídicos, tales como, pero sin limitación, enlaces disulfuro de restos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. En realizaciones particulares, las moléculas de diacuerpo de la presente invención comprenden además una región Fc, que permite la modificación por ingeniería de la funcionalidad de tipo anticuerpo en la molécula.

2. Antecedentes de la invención

El diseño de diacuerpos covalentes se basa en la construcción del fragmento Fv monocatenario (scFv) (Holliger *et al.* (1993) "Diabodies Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6444-6448. En una IgG no modificada, intacta, los dominios VL y VH se ubican en diferentes cadenas polipeptídicas, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión al epítipo del anticuerpo. Por el contrario, la construcción scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en una sola cadena polipeptídica, en la que los dominios están separados por un enlazador flexible de suficiente longitud para permitir el autoensamblaje de los dos dominios produciendo un sitio de unión al epítipo funcional. Cuando el autoensamblaje es imposible debido a un enlazador de insuficiente longitud (inferior a aproximadamente 12 restos de aminoácido), dos de las construcciones scFv interactúan entre sí formando una molécula bivalente, asociándose la región VL de una cadena con la región VH de la otra (revisado en Marvin *et al.* (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658). Además, la adición de un resto de cisteína al extremo C-terminal de la construcción ha demostrado permitir los enlaces disulfuro de las cadenas polipeptídicas, estabilizando el dímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente (véase, por ejemplo, Olafsen *et al.* (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27). Además, cuando se seleccionan dominios VL y VH de diferente especificidad, no solo es posible construir una molécula bivalente, sino también biespecífica.

Los diacuerpos bivalentes tienen una amplia selección de aplicaciones que incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La bivalencia permite tener gran flexibilidad en el diseño y la modificación por ingeniería del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando mejor avidéz hacia los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y la dirección dirigida a tipos específicos de células basándose en la presencia de ambos antígenos diana. Debido a su mayor valencia, bajas constantes de disociación y aclaramiento rápido de la circulación (para diacuerpos de pequeño tamaño, en o por debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han demostrado un uso particular en el campo de la generación de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", *Protein Eng.* 10:1221). Es de importancia particular la reticulación de diferentes células, por ejemplo, la reticulación de linfocitos T citotóxicos con células tumorales (Staerz *et al.* (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", *Nature* 314:628-631 y Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305). Los dominios de unión al epítipo de diacuerpos también pueden dirigirse a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria, tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK) u otras células mononucleares. En múltiples estudios, también se encontró que la unión de los diacuerpos a los determinantes de células efectoras, por ejemplo, los receptores de Fcγ (FcγR), activan las células efectoras (Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", *Cancer Res.* 59:2909-2916). Normalmente, la activación de células efectoras se desencadena por la unión de un anticuerpo unido al antígeno a una célula efectora a través de la interacción de Fc y FcγR; por tanto, en este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si estas contienen un dominio Fc (por ejemplo, según lo ensayado en algún ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento (por ejemplo, ensayo ADCC)). Mediante la reticulación de células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo lleva la célula efectora a las proximidades de las células tumorales, sino que conduce a la destrucción eficaz del tumor (véase, por ejemplo, Cao *et al.* (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55, 171-197).

65

2.1 RECEPTORES DE CÉLULAS EFECTORAS Y SUS PAPELES EN EL SISTEMA INMUNITARIO

En la función inmunitaria tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da lugar a una amplia selección de respuestas, que varían de las funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos y la fagocitosis ante señales inmunomoduladoras, tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores de superficie de células especializadas en células hematopoyéticas. La diversidad de las respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos inmunitarios se debe a la heterogeneidad estructural de los receptores de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión al antígeno estructuralmente relacionados que supuestamente median en la señalización intracelular.

Los receptores de Fc γ , miembros de la superfamilia de proteínas de los genes de inmunoglobulina, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la parte Fc γ de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos mediante un dominio de reconocimiento en la cadena alfa del receptor de Fc γ . Los receptores de Fc γ se definen por su especificidad hacia los subtipos de inmunoglobulina. Los receptores de Fc γ para la IgG se conocen como Fc γ R, para la IgE, como Fc ϵ R, y para la IgA, como Fc α R. Diferentes células auxiliares portan receptores de Fc γ para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares participarán en una determinada respuesta. *et al.* (1991) "Fc Receptors", *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92; Gerber J. S. *et al.* (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc γ Receptors", *Microbes and Infection*, 3: 131-139; Billadeau D. D. *et al.* (2002), "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation", *The Journal of Clinical Investigation*, 2(109): 161-1681; Ravetch J. V. *et al.* (2000) "Immune Inhibitory Receptors", *Science*, 290: 84-89; Ravetch J. V. *et al.*, (2001) "IgG Fc Receptors" *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90; Ravetch J. V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux", *Cell*, 78(4): 553-60). Los diferentes receptores de Fc γ , las células que los expresan y su especificidad por el isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptada de "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease", 4ª ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores de Fc γ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de la membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto de tipo C2 de dominios relacionados con la inmunoglobulina, un solo dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Existen tres Fc γ R conocidos, denominados Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) y Fc γ RIII(CD16). Los tres receptores están codificados por distintos genes; sin embargo, la extensa homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común, quizás mediante duplicación génica.

Fc γ RII(CD32)

Las proteínas Fc γ RII son glicoproteínas integrales de la membrana de 40 kDa que solo se unen a la IgG complejada debido a una baja afinidad hacia la Ig monomérica ($10^6 M^{-1}$). Este receptor es el receptor Fc γ R que se expresa más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Fc γ RII solo tiene dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a la inmunoglobulina y, por tanto, tiene una afinidad mucho menor hacia IgG que hacia Fc γ RI. Existen tres genes de Fc γ RII humanos (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C), uniéndose todos ellos a la IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Distintas diferencias dentro de los dominios citoplasmáticos de Fc γ RII-A y Fc γ RII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas ante la ligadura del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular tal como puede ser la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitorias, por ejemplo, Inhibiendo la activación de los linfocitos B.

Fc γ RIII (CD16)

Debido a la heterogeneidad de esta clase, el tamaño de Fc γ RIII varía entre 40 y 80 kDa en el ratón y en el ser humano. Dos genes humanos codifican dos transcripciones, Fc γ RIIIA, una glicoproteína integral de la membrana, y Fc γ RIIIB, una versión unida a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un Fc γ RIII homólogo a Fc γ RIIIA humano que engloba la membrana. Fc γ RIII comparte características estructurales con cada uno de los dos Fc γ R. Al igual que Fc γ RII, Fc γ RIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios de tipo Ig extracelulares correspondientes. Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y el único Fc γ R en linfocitos NK. En la actualidad, se sabe que Fc γ RIIIB unido a GPI solo se expresa en neutrófilos humanos.

Señalización a través de Fc γ R

Las señales de activación e inhibición son transducidas a través de los Fc γ R tras la ligadura. Estas funciones diametralmente opuestas se deben a las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplasmáticos del receptor denominados motivos de

- 5 activación basados en tirosina de inmunoreceptores (ITAM) o motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIM) son los responsables de las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB.
- 10 Los neutrófilos humanos expresan el gen de FcγRIIA. El agrupamiento de FcγRIIA a través de complejos inmunitarios o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar los ITAM junto con las quinasas asociadas a receptores que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de los ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación produce la activación de sustratos cadena abajo (por ejemplo, PI₃K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.
- 15 El gen de FcγRIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es idéntico al 96 % a FcγRIIA, y se une a los complejos de IgG de manera casi idéntica. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se liga junto con un FcγR activador, el ITIM de FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros del fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, impidiendo, por consiguiente, el flujo de entrada de Ca⁺⁺ intracelular. De este modo, la reticulación de FcγRIIB atenúa la respuesta activadora a la ligadura de FcγR e inhibe la respuesta celular.
- 20 De este modo, se inhibe la activación de los linfocitos B, la proliferación de los linfocitos B y la secreción de los anticuerpos.
- 25 Los documentos WO2006/113665 y US2007/004909 describen moléculas de diacuerpo y los usos de las mismas en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo trastornos inmunológicos, enfermedad infecciosa, intoxicación y cánceres. Las moléculas de diacuerpo comprenden dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión al epítipo, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes en antígenos iguales o diferentes.
- 30 El documento US2003/207346 describe un método de preparación de polipéptidos hetero-multiméricos tales como anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas biespecíficas y quimeras de anticuerpo-inmunoadhesina.
- 35 Lu Dan *et al* (2005. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, n.º 20, páginas 19665-19672; DOI: 10.1074/JBC.M500815200) describe un anticuerpo biespecífico de tipo IgG recombinante completamente humano tanto contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico como contra el receptor de factor de crecimiento insulínico para una actividad antitumoral potenciada.
- 40 Lu Dan *et al* (2003. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 279, n.º 1-2, páginas 219-232; D01:10.1016/S0022-1759(03)00251-5) describe un di-diacuerpo: una molécula de anticuerpo biespecífica tetravalente.
- 45 El documento WO 02/02781 describe la producción de anticuerpos bi- o tetravalentes, biespecíficos o multiespecíficos, usando métodos de ADN recombinante y métodos de producción recombinante. El anticuerpo resultante consiste en una o dos moléculas de anticuerpo que se heterodimerizan mediante la creación de una proteína de fusión con los dominios constantes de inmunoglobulina CL y CH1.
- 50 Alt *et al* (1999. *FEBS letters*, Elsevier, Vol. 454, n.º 1-2, páginas 90-94; D01:10.1016/50014-5793(99)00782-6) describe moléculas de anticuerpo de tipo IgG tetravalentes y biespecíficas que combinan diacuerpos monocatenarios con la región Fc o CH3 de inmunoglobulina gamma.
- Wu *et al* (2001. *Protein Engineering*, Oxford University Press, Vol. 14, n.º 12, páginas 1025-1033; D01:10.1093/PROTEIN/14.12.1025) describe que la multimerización de una proteína de fusión Fv-Fc monocatenaria anti-CD20 quimérica es mediada a través del intercambio de dominios variables.

TABLA 1. Receptores para las regiones Fc de isotipos de inmunoglobulinas

Receptor Unión	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
	IgG1 $10^8 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $2 \times 10^6 M^{-1}$	IgG1 $5 \times 10^5 M^{-1}$	IgE $10 \times 10 M^{-1}$	IgA1, IgA2 $10^7 M^{-1}$
Tipo de célula	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhan	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Mastocitos	Linfocitos NK Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
Efecto de la ligadura	Captación Estimulación Activación del estallido respiratorio Inducción de la destrucción	Captación Liberación granular	Captación, Inhibición de estimulación	Sin captación, Inhibición de estimulación	Inducción de la destrucción	Secreción de gránulos	Captación, Inducción de la destrucción

3. Sumario de la invención

El ámbito de la presente invención está definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no se encuentre en las reivindicaciones se proporciona solo a efectos informativos.

La presente invención se refiere a los diacuerpos covalentes y/o moléculas de diacuerpo covalentes y a su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo cáncer, trastornos autoinmunes, trastornos alérgicos y enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, hongos o virus. Preferentemente, el diacuerpo de la presente invención puede unirse a dos epítomos diferentes en dos células diferentes, en las que el primer epítomo se expresa en un tipo de célula diferente a la del segundo epítomo, de modo que el diacuerpo puede unir las dos células entre sí.

En una realización, La presente invención se dirige a una molécula de diacuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 del presente documento.

En ciertos aspectos de la invención, el primer epítomo, el segundo epítomo, y cuando proceda, el tercer y cuarto epítomo pueden ser iguales. En otros aspectos, el primer epítomo, el segundo epítomo, y cuando proceda, el tercer y cuarto epítomo pueden ser diferentes entre sí. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión al epítomo, el primer epítomo y el tercer epítomo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión al epítomo, el primer y cuarto epítomo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión al epítomo, el segundo epítomo y el tercer epítomo pueden ser iguales. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión al epítomo, el segundo epítomo y el tercer epítomo pueden ser iguales. En aspectos preferidos de la invención, el primer epítomo y el segundo epítomo son diferentes. En otros aspectos más de la invención que comprenden un tercer dominio de unión al epítomo y un cuarto dominio de unión al epítomo, el tercer y cuarto epítomo pueden ser diferentes. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente invención.

En aspectos particulares de la invención, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivarse de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto más, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. En otro aspecto más, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula del diacuerpo pueden derivarse de una inmunoglobulina diferente. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente invención.

En determinados aspectos de la invención, la unión covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o de molécula de diacuerpo puede ser a través de un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica y al menos un resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica. Los restos de cisteína en la primera o segunda cadenas polipeptídicas que son responsables de los enlaces disulfuro pueden encontrarse en cualquier parte de la cadena polipeptídica, así como dentro del primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto dominios. En una realización específica, el resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica se encuentra en el primer dominio y el resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica se encuentra en el quinto dominio. El primer, segundo, cuarto y quinto dominios corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En las realizaciones preferidas, los restos de cisteína responsables de los enlaces disulfuro entre la primera y segunda cadena polipeptídica se ubican dentro del tercer y sexto dominios, respectivamente. En un aspecto particular de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 17**). En otro aspecto de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 17**). En otro aspecto más de dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO:80**). En otro aspecto de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO:79**), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO:80**). En determinados aspectos de dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO:79**). En otros aspectos de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO:79**). En otros aspectos más de dicha realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio bisagra. En otros aspectos de la dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio bisagra. En otros aspectos más de la dicha

realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el sexto dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc o una parte del mismo. En otros aspectos más de dicha realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO:23**); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc o una parte del mismo.

En otras realizaciones, los restos de cisteína de la primera o segunda cadena polipeptídica que son responsables de los enlaces disulfuro pueden estar ubicados fuera del primer, segundo o tercer dominios de la primera cadena polipeptídica y fuera del cuarto, quinto y sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica. En particular, el resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al primer dominio o puede ser C-terminal respecto al primer dominio. El resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal respecto al segundo dominio. El resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal respecto al tercer dominio. Además, El resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal respecto al cuarto dominio. El resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal respecto al quinto dominio. Por consiguiente, El resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica puede ser C-terminal respecto al sexto dominio o puede ser N-terminal respecto al sexto dominio. En un aspecto particular, el enlace disulfuro puede estar entre al menos dos restos de cisteína de la primera cadena polipeptídica y al menos dos restos de cisteína de la segunda cadena polipeptídica. En un aspecto particular, en el que el tercer dominio y el sexto dominio no comprenden un dominio Fc, o una parte del mismo, el resto de cisteína puede estar en el extremo C-terminal de la primera cadena polipeptídica y en el extremo C-terminal de la segunda cadena polipeptídica. Se ha de entender que cualquier combinación de los anteriores está comprendida en la presente invención.

En realizaciones específicas de la invención descritas anteriormente, el diacuerpo covalente de la invención engloba dímeros de moléculas de diacuerpo, en los que cada molécula de diacuerpo comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas. En ciertos aspectos de dicha realización, las moléculas de diacuerpo pueden estar unidas de manera covalente para formar el dímero, con la condición de que la unión covalente no sea un enlace peptídico. En aspectos preferidos de dicha realización, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. En otros aspectos preferidos más de la presente invención, la unión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo que forman el dímero, en el que el al menos un resto de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primera cadena polipeptídica.

Como se ha analizado anteriormente, los dominios de las cadenas polipeptídicas individuales están unidos de manera covalente. En aspectos específicos, el enlace covalente entre el primer y segundo dominio, el primer y tercer dominio, el segundo y tercer dominio, el cuarto y quinto dominio, el cuarto y sexto dominio, y/o el quinto y sexto dominio puede ser un enlace peptídico. En particular, el primer y segundo dominio, y el cuarto y quinto dominio pueden estar separados por el tercer dominio y el sexto dominio, respectivamente, o por restos de aminoácidos adicionales, siempre que el primer y segundo, y el cuarto y quinto dominio no se asocien para formar un sitio de unión. El número de restos de aminoácido puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácido. En un aspecto preferido, el número de restos de aminoácido entre los dominios es de 8.

En ciertos aspectos, los dominios de la primera y segunda cadena polipeptídica que comprenden un dominio Fc, es decir, opcionalmente, el tercer y sexto dominio, respectivamente, pueden comprender además un dominio bisagra de modo que el dominio comprenda una región bisagra-Fc. En realizaciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden comprender un dominio bisagra sin comprender también un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas ligeras, regiones bisagra, dominios Fc y/o dominios bisagra-Fc para su uso en la invención pueden obtenerse de cualquier tipo de inmunoglobulina, incluyendo la IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En un aspecto preferente, el tipo de inmunoglobulina es IgG, o cualquier subtipo de esta, es decir, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. En otros aspectos, la inmunoglobulina de la que se obtienen las cadenas ligeras y pesadas está humanizada o quimerizada.

Además, el primer epítipo y el segundo epítipo son diferentes, y, cuando sea aplicable, el tercer epítipo y el cuarto epítipo, al que se une el diacuerpo o la molécula de diacuerpo pueden ser diferentes epítipos del mismo antígeno o pueden ser diferentes epítipos de antígenos diferentes. Los antígenos pueden ser cualquier molécula contra la que se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión al epítipo del diacuerpo es específico de un antígeno en una determinada célula, tal como un linfocito B, un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citotóxico natural (NK) o una célula dendrítica.

En ciertos aspectos de la presente realización, al menos un sitio de unión al epítipo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico de un receptor de Fc, receptor de Fc que puede ser un receptor de Fc activador o un receptor de Fc inhibidor. En aspectos particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fc γ , y el receptor de Fc γ es un receptor Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII. En aspectos más preferidos, el receptor Fc γ RIII es un receptor Fc γ RIIIA (CD16A) o

el receptor FcγRIIIB (CD16B), y, más preferentemente, el receptor FcγRIII es el receptor FcγRIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor FcγRII es el receptor FcγRIIA (CD32A) o el receptor FcγRIIB (CD32B), y más preferentemente, el receptor FcγRIIB (CD32B). En un aspecto particularmente preferido, un sitio de unión del diacuerpo es específico de CD32B y el otro sitio de unión es específico de CD16A. En una realización específica de la invención, al menos un sitio de unión al epítipo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico de un receptor de Fc activador y al menos otro sitio es específico de un receptor de Fc inhibidor. En ciertos aspectos de dicha realización, el receptor de Fc activador es CD32A y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos de dicha realización, el receptor de Fc activador es BCR y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otros aspectos más de dicha realización, el receptor de Fc activador es IgE1 y el receptor de Fc inhibidor es CD32B.

En los casos en los que un sitio de unión al epítipo es específico de CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 3G8 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se establece en el presente documento. En otros casos en los que un sitio de unión al epítipo es específico de CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo IV.3 de ratón. En otros casos más en los que un sitio de unión al epítipo es específico de CD32B, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo 2B6 murino, cuya secuencia ha sido clonada y se establece en el presente documento. Se ha de entender que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 e IV.3 puede usarse en cualquier combinación. La presente invención también se refiere a un diacuerpo o a una molécula de diacuerpo biespecífico, en el que el primer epítipo es específico de CD32B, y el segundo epítipo es específico de CD16A.

En otros aspectos, un sitio de unión al epítipo puede ser específico de un antígeno patógeno. Como se usa en el presente documento, un antígeno patógeno es un antígeno implicado en una enfermedad patógena específica, incluyendo el cáncer, infección y enfermedad autoinmune. Por lo tanto, el antígeno patógeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico o un antígeno autoinmune. Los antígenos patógenos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, lipopolisacárido, antígenos víricos seleccionados de grupo que consiste en antígenos víricos de virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus del Nilo Occidental (por ejemplo, los antígenos E16 y/o E53) y virus de hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferentemente, el antígeno patógeno es un antígeno neutralizante. En un aspecto preferido, cuando un sitio de unión al epítipo es específico de CD16A o CD32A, el otro sitio de unión al epítipo es específico de un antígeno patógeno, excluyendo los antígenos autoinmunes. En otro aspecto preferido más, cuando un sitio de unión al epítipo es específico de CD32B, el otro sitio de unión al epítipo es específico de cualquier antígeno patógeno. En realizaciones específicas, la molécula de diacuerpo de la invención une dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico de un receptor de Fc activador, mientras que el otro es específico de un receptor de Fc inhibidor. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo une dos epítipos neutralizantes víricos diferentes, por ejemplo, pero sin limitación, E16 y E53 del virus del Nilo Occidental.

En otra realización más de la presente invención, los diacuerpos de la invención se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. Por consiguiente, la presente invención se dirige a una molécula de diacuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 9 del presente documento. El uso terapéutico puede comprender administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o una molécula de diacuerpo de la invención en la que al menos un sitio de unión es específico de un antígeno patógeno, tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula cancerosa o en la superficie de una bacteria o de un virión, y al menos otro sitio de unión es específico de un receptor de Fc, por ejemplo, CD16A.

El uso terapéutico puede comprender administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo o una molécula de diacuerpo de la invención, en el que al menos un sitio de unión es específico de CD32B y al menos otro sitio de unión es específico de CD16A.

En otra realización más, el uso terapéutico es en un método para inducir tolerancia inmunitaria a un antígeno patógeno, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o una molécula de diacuerpo covalente de la invención, en el que al menos un sitio de unión es específico de CD32B y al menos otro sitio de unión es específico de dicho antígeno patógeno. En aspectos de dicha realización, el antígeno patógeno puede ser un alérgeno u otra molécula hacia la que se desee tolerancia inmunitaria, tal como una proteína expresada en tejido trasplantado.

En otra realización más, el uso terapéutico es en un método para la desintoxicación, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o una molécula de diacuerpo covalente de la invención, en el que al menos un sitio de unión es específico de un marcador de superficie celular y al menos otro sitio de unión es específico de una toxina. En aspectos particulares, el diacuerpo de la invención que va a administrarse es uno en el que un sitio de unión es específico de un marcador de superficie celular tal como un Fc y el otro sitio de unión es específico de una toxina bacteriana o de un fármaco. En un aspecto, el marcador de superficie celular no se encuentra en los glóbulos rojos.

3.1 DEFINICIONES

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos o terminología científicos que se usan en el presente documento pretenden tener los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la técnica. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1999, incluyendo los suplementos hasta 2001); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", tercera edición (Sambrook y Russel, 2001); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); "The Immunoassay Handbook" (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); "Methods of Immunological Analysis" (R. Masseyeff, W. H. Albert y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; y Beaucage *et al.* eds., "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000).

Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos Fv biespecíficos unidos por enlaces disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id frente a los anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une de manera inmuno-específica", "reconoce de manera inmuno-específica", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y las expresiones análogas se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, epítipo o complejo inmunitario) y no se une específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según lo determinado, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, "complejo inmunitario" se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido que contiene la región Fc γ heterólogo se une a otro formando un complejo de mayor peso molecular. Son ejemplos de complejos inmunitarios los complejos de antígeno-anticuerpo que pueden ser solubles o particulados (por ejemplo, un complejo de antígeno/anticuerpo en una superficie celular).

Como se usan en el presente documento, las expresiones "cadena pesada", "cadena ligera", "región variable", "región marco conservada", "dominio constante" y similares, tienen su significado común en la técnica inmunológica, y se refieren a los dominios de las inmunoglobulinas naturales y a los dominios correspondientes de las proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, normalmente expresadas como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La parte amino-terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un solo dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. Por lo tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (en la que H es la región bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los restos que están en contacto con el antígeno y segmentos que no son CDR, a los que se conoce como segmentos marco, que, en general, mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de CDR (aunque ciertos restos marco también pueden estar en contacto con el antígeno). Por lo tanto, los dominios V_L y V_H tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a las proteínas o anticuerpos de unión (como se definen ampliamente en el presente documento), la asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los

aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas son designadas por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para los anticuerpos, identificó una secuencia consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de restos a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat puede extenderse a los anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat haciendo referencia a aminoácidos conservados. Este método para asignar números de restos se ha vuelto una norma en el campo e identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes de diferentes anticuerpos, incluyendo las variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido que está en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo murino.

Como se usan en el presente documento, la expresión “cadena pesada” se usa para definir la cadena pesada de un anticuerpo IgG. En una IgG natural, intacta, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU tal como en Kabat *et al.*, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5ª Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991). El “índice EU como en Kabat” se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humano. Los ejemplos de las secuencias de aminoácido que contienen los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 humana se muestran en las **FIG. 1A y 1B** como se describe, *infra*. Las **FIG. 1A y 1B** también muestran secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 e IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, lo que forma los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los restos están numerados con el índice EU.

La “región bisagra” o “dominio bisagra”, en general, se define como el tramo desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de la IgG1 humana se presenta en la **FIG. 1A** (los restos de aminoácido de la **FIG. 1A** están numerados de acuerdo con el sistema Kabat). Las regiones bisagra de los otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones como se muestra en la **FIG. 1A**.

Como se usa en el presente documento, la expresión “región Fc”, “dominio Fc” o las expresiones análogas se usan para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. En la **FIG. 1B**, se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana. Aunque los contornos pueden variar ligeramente, según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los restos de aminoácido de la **FIG. 1B** están numerados de acuerdo con el sistema Kabat). La **FIG. 1B** también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de IgG IgG2, IgG3 e IgG4.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 231 hasta el aminoácido 341 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (**FIG. 1B**). El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (**FIG. 1B**). El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (al que también se le conoce como dominio “Cy2”) tiene la exclusividad de que no se aparea estrechamente con otro dominio. En cambio, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una IgG natural, intacta.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “proteína de unión al FcγR”, “anticuerpo contra FcγR” y “anticuerpo anti-FcγR”, se usan de manera indistinta y se refieren a una variedad de proteínas de tipo inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina. Las “proteínas de unión a FcγR” se unen a FcγR a través de una interacción con los dominios V_L y/o V_H (a diferencia de la unión mediada por Fcγ). Los ejemplos de las proteínas de unión a FcγR incluyen anticuerpos completamente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (por ejemplo, que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras), fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, por ejemplo, Lanzavecchia *et al.* (1987) “The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes”, *Eur. J. Immunol.* 17:105-111), anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins”, *Science* 242:423-26), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión presentadoras de fagos), “minicuerpos” (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.837.821) y otras proteínas de unión al antígeno que contengan un dominio V_L y/o V_H o fragmento del mismo. En un aspecto, la proteína de unión a FcγRIIIA es un “anticuerpo tetramérico” es decir, que, en general, tiene la estructura de una IgG natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que comprenden un dominio V_L y un dominio constante de cadena ligera y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio V_H y dominios bisagra y constante de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, la expresión “antagonistas de FcγR” y las expresiones análogas se refieren a sustancias proteicas y no proteicas, incluyendo las moléculas pequeñas que antagonizan en al menos una actividad biológica de un FcγR, por ejemplo, bloquean la señalización. Por ejemplo, las moléculas de la invención bloquean la señalización bloqueando la unión de las IgG a un FcγR.

Como se usa en el presente documento, el término “derivado”, en el contexto de los polipéptidos o de las proteínas, se refiere a un polipéptido o a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada

mediante la introducción de sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. El término “derivado” como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o a una proteína que se ha modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o a la proteína. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un antígeno u otra proteína celular, etc. Un polipéptido o una proteína derivada puede producirse mediante modificaciones químicas usando las técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de polipéptido o de proteína presenta una función similar o idéntica a la del polipéptido o la proteína del que se derivó.

Como se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero sin limitación, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o eliminación de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede esterificarse, alquilarse y/o fosforilarse.

Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula de diacuerpo” se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, que comprenden cada una al menos un dominio VL y un dominio VH o fragmento de los mismos, en la que ambos dominios están comprendidos dentro de una sola cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones “molécula de diacuerpo” incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. Dichas cadenas polipeptídicas del complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En aspectos específicos, la expresión “molécula de diacuerpo” incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen tanto un dominio VL y VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar unidas de manera covalente a al menos otro péptido del multímero por enlaces disulfuro entre las cadenas.

Como se usa en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera indistinta para referirse a un estado en un sujeto. En particular, la expresión “enfermedad autoinmune” se usa de manera indistinta con la expresión “trastorno autoinmune” para referirse a una afección en un sujeto caracterizado por lesión celular, tisular y/o orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión “enfermedad inflamatoria” se usa indistintamente con la expresión “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto, caracterizado por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden estar asociados o no con la inflamación. Además, la inflamación puede ser provocada o no por un trastorno autoinmune. Por lo tanto, algunos trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunes como inflamatorios.

“Cadenas polipeptídicas idénticas”, como se usa en el presente documento, también se refiere a cadenas polipeptídicas que tengan secuencia de aminoácidos casi idéntica, por ejemplo, incluyendo las cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas de aminoácidos, de modo que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no sea significativamente diferente.

Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a una neoplasia o a un tumor resultante del crecimiento no controlado, anómalo, de las células. Como se usa en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un tumor benigno, que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se dispersa a lugares distantes. En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con un antígeno específico de cáncer.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente inmunomodulador” y variaciones de la misma se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un hospedador. En determinadas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En determinadas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término “epítopo” se refiere a un fragmento de un polipéptido o de una proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y lo más preferentemente, en un ser humano. Un epítopo que tenga actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína que genera una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítopo que tenga actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína al que se une de manera inespecífica un anticuerpo, como se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos. No es necesario que los epítomos antigénicos sean inmunogénicos.

Como se usa en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos contiguos, al menos 10 restos de aminoácidos contiguos, al menos 15 restos de aminoácidos contiguos, al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, al menos 25

restos de aminoácidos contiguos, al menos 40 restos de aminoácidos contiguos, al menos 50 restos de aminoácidos contiguos, al menos 60 restos de aminoácidos contiguos, al menos 70 restos de aminoácidos contiguos, al menos 80 restos de aminoácidos contiguos, al menos 90 restos de aminoácidos contiguos, al menos 100 restos de aminoácidos contiguos, al menos 125 restos de aminoácidos contiguos, al menos 150 restos de aminoácidos contiguos, al menos 175 restos de aminoácidos contiguos, al menos 200 restos de aminoácidos contiguos o al menos 250 restos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitación, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras principales modificadas que les otorgan atributos beneficiosos para las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o una capacidad aumentada para atravesar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o las secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarios, bicatenarios, o pueden contener partes monocatenarias y bicatenarias, y pueden contener partes tricatenarias, pero es, preferentemente, ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar un trastorno o una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o reducir al mínimo el inicio de la enfermedad, por ejemplo, retardar o reducir al mínimo la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o combinado con otros tratamientos, que proporciona un beneficio terapéutico para el tratamiento o control de una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que se pueda usar para la prevención de un trastorno, o la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para impedir la recurrencia o la propagación de una enfermedad hiperproliferativa, en particular, cáncer, o la presencia de dicha enfermedad en un paciente, incluyendo, pero sin limitación, aquellos que están predispuestos a la enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos que están genéticamente predispuestos al cáncer o previamente expuestos a agentes cancerígenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporcione un beneficio profiláctico para la prevención de una enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa aquella cantidad de agente profiláctico solo, o en combinación con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico para la prevención de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, los términos “prevenir”, y “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia o del inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, la expresión “en combinación” se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión “en combinación” no limita el orden en el que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante con, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

“Función efectora” como se usa en el presente documento significa un evento bioquímico debido a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o un antígeno. Las funciones efectoras incluyen, pero sin limitación, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen aquellas que tienen lugar tras la unión de un antígeno y aquellas que tienen lugar independientes de la unión al antígeno.

“Célula efectora”, como se usa en el presente documento, significa una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhan, linfocitos citolíticos naturales (NK) y pueden ser de cualquier organismo incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “se une específicamente a un complejo inmunitario” y las

expresiones análogas se refieren a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un complejo inmunitario puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según lo determinado mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Una “proteína de fusión estable”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión que experimenta un nivel de degradación mínimo a no detectable durante la producción y/o almacenamiento, evaluado usando ensayos bioquímicos y funcionales comunes conocidos por los expertos en la materia, y puede almacenarse durante un período de tiempo prolongado sin pérdida de la actividad biológica, por ejemplo, la unión a FcγR.

4. Breve descripción de los dibujos

FIGS. 1 A-B SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES CH1, BISAGRA y Fc DE IgG HUMANA

La Figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra (A) y Fc (B) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. (Dominio bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 1**); dominio bisagra de IgG2 (**SEQ ID NO: 2**); dominio bisagra de IgG3 (**SEQ ID NO: 3**); dominio bisagra de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**); dominio Fc de IgG1 (**SEQ ID NO: 5**); dominio Fc de IgG2 (**SEQ ID NO: 6**); dominio Fc de IgG3 (**SEQ ID NO: 7**); dominio Fc de IgG1 (**SEQ ID NO: 8**)). Los restos de aminoácidos que se muestran en las FIG. 1A y 1B se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias isotipo se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, lo que forma los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la **Figura 1B**, los restos del dominio CH2 están indicados por +, mientras que los restos del dominio CH3 están indicados por ~.

FIG. 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS DE DIACUERPOS BIFUNCIONALES COVALENTES

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de anticuerpo y un dominio VH de anticuerpo separados por un enlazador peptídico corto. El enlazador de 8 restos de aminoácido evita el autoensamblaje de una sola cadena polipeptídica en construcciones scFv, y, en cambio, las interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas polipeptídicas predominantes. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal (“n”), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal (“c”), lado derecho de la figura): construcción (1) (**SEQ ID NO: 9**) que se compone de n-el dominio VL Hu2B6 – enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (2) (**SEQ ID NO: 11**) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (3) (**SEQ ID NO: 12**) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (4) (**SEQ ID NO: 13**) que se compone de n-el dominio VL Hu2B6 - enlazador (GGGSGGGG (**ID SEC NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6 – y una secuencia C-terminal (LGGC)-c.

FIG. 3 ANÁLISIS DE SDS-PAGE DE LOS DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Se sometieron diacuerpos purificados por afinidad a análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras (carriles 1-3) o no reductoras (carriles 4-6). Se indican los pesos moleculares aproximados del patrón (entre los carriles 3 y 4). Carriles 1 y 4, CMD h3G8; Carriles 2 y 5, CMD h2B6; y Carriles 3 y 6, CBD h2B6-h3G8.

FIG. 4 A-B ANÁLISIS DE SEC DE DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Se sometieron diacuerpos purificados por afinidad a análisis de SEC. (A) Perfil de elución de patrones conocidos: IgG de longitud completa (~150 kDa), fragmento Fab de IgG (~50 kDa) y scFv (~30 kDa); (B) Perfil de elución de CMD h2b6, CMD h3G8 y CBD h2B6-h3G8.

FIG. 5 UNIÓN de CBD h2B6-h3G8 A LAS PROTEÍNAS sCD32B Y sCD16A

Se ensayó la unión del CBD h2B6-h3G8 a las proteínas sCD32B y sCD16A en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se usó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP. Como control, se usó CMD h3G8, que se une a CD16A.

FIGS. 6A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A, sCD32B Y sCD32B

La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A, sCD32B y sCD32A (control negativo) se ensayó mediante análisis de SPR. También se ensayó como control scFv h3G8. (A) Unión a sCD16; (B) unión a sCD32B y (C) unión a sCD32A. Los diacuerpos se inyectaron a una concentración de 100 nM, y el fragmento scFv a una

concentración de 200 mM, sobre las superficies receptoras a un caudal de 50 ml/min durante 60 s.

7 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPO A sCD16A y sCD32B

5 La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A y sCD32B se ensayó mediante análisis de SPR. El fragmento scFv h3G8 también se ensayó como control. (A) Unión de CMD h3G8 a sCD16A; (B) unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD16A; (C) unión de scFv h3G8 a sCD16A; (D) unión de CMD h2B6 a sCD32B; y (E) unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD32B. Los diacuerpos se inyectaron a concentraciones de 6,25-200 nM sobre superficies receptoras a un caudal de 70 ml/min durante 180 s.

10 **FIG. 8 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS VL Y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO BIESPECÍFICA COVALENTE**

15 NH₂ y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el resto de cisteína C-terminal en cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las partes enlazadoras de dichas cadenas. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión al epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

20 **FIG. 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES**

25 Representación de las construcciones polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (5) (SEQ ID NO: 14) que se compone de n-dominio VL Hu2B6 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – un segundo enlazador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; construcción (6) (SEQ ID NO: 15) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y el segundo enlazador (LGGC)- y un dominio Fc C-terminal de IgG1 humana-c; construcción (7) (SEQ ID NO: 16) que se compone de n-el dominio VL Hu2B6 – un primer enlazador (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) – el dominio VH de Hu3G8 – y una secuencia C-terminal (LGGCFNRGEC) (SEQ ID NO: 17)-c; construcción (8) (SEQ ID NO: 18) que se compone de n-el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (ID SEC NO: 10)) – el dominio VH de Hu2B6 – y un segundo enlazador (LGGC)- y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana (con sustitución de aminoácido A215V)-c.

35 **FIG. 10 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc A sCD32B Y sCD16A**

40 Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y cotransfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP.

45 **FIG. 11 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS DOS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE COMPRENDEN CADA UNA UN DOMINIO Fc PARA FORMAR UN DIACUERPO BIVALENTE, COVALENTE**

50 NH₂ y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de la segunda secuencia enlazadora de cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes enlazadoras de dichas cadenas. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión al epítipo específico de CD32B y CD16, respectivamente.

55 **FIG. 12 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS BISAGRA/Fc A sCD32B Y sCD16A**

60 Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A en un ensayo ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 4 sistemas de expresión recombinante: cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente; y cotransfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan las construcciones 7 y 8, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP.

65

FIG. 13 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO TETRAMÉRICA

5 NH₂ y COOH representan los grupos amino-terminal y carboxi-terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína en la segunda secuencia enlazadora de la cadena polipeptídica, 'más pesada', que porta el dominio Fc y un resto de cisteína en la secuencia C-terminal de la cadena polipeptídica 'más ligera' que no porta Fc. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas punteadas y discontinuas son para distinguir entre cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras partes enlazadoras de las cadenas más pesadas o el enlazador de dichas cadenas más ligeras. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión al epitopo específico de CD32B y CD16, respectivamente.

FIG. 14 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN DOMINIOS Fc QUE FORMAN DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

15 Representación de construcciones polipeptídicas que forman las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (9) (**SEQ ID NO: 19**) compuesta de un dominio bisagra/Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6 – enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – y una secuencia LGGC C-terminal-c; construcción (10) (**SEQ ID NO: 20**) compuesto de n-un dominio Fc de la IgG1 humana – el dominio VL Hu3G8 – enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6 - enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – y una secuencia LGGC C-terminal-c; construcción (11) (**SEQ ID NO: 21**) compuesto de n-el dominio VL Hu2B6 (G105C) - enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu3G8 – y un dominio bisagra/Fc C-terminal de IgG1 humana con sustitución de aminoácido A215V-C; construcción (12) (**SEQ ID NO: 22**) compuesto de n-el dominio VL Hu3G8 - enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6 (G44C) – y una secuencia FNRGEC C-terminal (**SEQ ID NO: 23**)-c.

FIG. 15 A-B ANÁLISIS DE SDS-PAGE Y DE TRANSFERENCIA WESTERN DE LA AFINIDAD DE DIACUERPOS TETRAMÉRICOS

30 Los diacuerpos producidos mediante sistemas de expresión recombinante cotransfectados con vectores que expresan las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1, y las construcciones 11 y 12 se sometieron a análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y análisis de transferencia Western usando H+L anti-IgG1 humana de cabra como sonda (B). Las proteínas del gel SDS-PAGE se visualizaron con tinción con Simply Blue Safestain (Invitrogen). En ambos paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1, y las construcciones 11 y 12A están en las carriles 1, 2 y 3, respectivamente.

FIG. 16 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc Y ENLACES DISULFURO ENTRE CADENAS MODIFICADOS POR INGENIERÍA A sCD32B Y sCD16A

40 Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro modificados por ingeniería entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' a sCD32B y sCD16A en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinante: que expresan las construcciones 1 y 10, que expresan las construcciones 1 y 9, y que expresan las construcciones 11 y 12, respectivamente. Se usó la proteína sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP. Se usó como control la unión de h3G8.

FIG. 17 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO Y REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE CONTIENEN LOS DOMINIOS DE CADENA LIGERA LAMBDA Y/O BISAGRA

50 Representación de las construcciones polipeptídicas que comprenden las moléculas de diacuerpo de la invención (cada construcción se describe desde el extremo amino-terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi-terminal ("c"), lado derecho de la figura). Construcción (13) (**SEQ ID NO: 97**) que se compone de n-dominio VL 3G8 – un primer enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo enlazador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (**SEQ ID NO: 95**))-dominio VL de 2.4G2 – un tercer enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**))-dominio VH de 3G8 – y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica **SEQ ID NO: 97** se proporciona en **SEQ ID NO: 98**). Construcción (14) (**SEQ ID NO: 99**) que se compone de n-dominio VL 3G8 – un primer enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de 2.4G2VH – un segundo enlazador (LGGC)-sitio de reconocimiento de furina (RAKR (**SEQ ID NO: 95**))-FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa) dominio VL de 2.4G2-un tercer enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**))-dominio VH de 3G8- y un dominio LGGC C-terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica **SEQ ID NO: 99** se proporciona en **SEQ ID NO: 100**). Construcción (15) (**SEQ ID NO: 101**) que se compone de n-dominio VL Hu2B6 – un enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu3G8- y un dominio FNRGEC C-terminal (**SEQ ID NO: 23**); (la secuencia de nucleótidos que codifica **SEQ ID NO: 101** se proporciona en **SEQ ID NO: 102**). Construcción (16) (**SEQ ID NO: 103**)

que se compone de n- dominio VL Hu3G8 – un enlazador (GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 10**)) – el dominio VH de Hu2B6- y un dominio VEPKSC C-terminal (**SEQ ID NO: 79**); (la secuencia de nucleótidos que codifica **SEQ ID NO: 103** se proporciona en **SEQ ID NO: 104**).

5 **FIG. 18 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO DERIVADAS DE UNA MOLÉCULA PRECURSORA DE POLIPROTEÍNA A mCD32B Y sCD16A**

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo derivadas de la molécula precursora de poliproteína, construcción 13 (**SEQ ID NO: 97**) a CD32B murino (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Se usó mCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugada a biotina.

10 **FIG. 19 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS DE CADENA LAMBDA Y/O BISAGRA A sCD32B Y sCD16A**

15 Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios derivados del extremo C-terminal de cadena ligera lambda humana y/o el dominio bisagra de la IgG a sCD32B y sCD16A, y se comparó con el diacuerpo que comprende las construcciones 1 y 2 (**FIG. 5**) en un análisis de ELISA de tipo sándwich. Los diacuerpos ensayados se produjeron mediante el sistema de expresión recombinante que expresa las construcciones 15 y 16 (**SEQ ID NO: 101** y **SEQ ID NO: 103**, respectivamente). Se usó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria fue sCD16A conjugado a HRP. Las barras con cuadros pequeños representan la combinación de las construcciones 15/16, mientras que las barras con cuadros grandes representan la combinación de las construcciones 1/2.

20 **FIG. 20 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE DART 2B6/4420 UNIDO A CD32B UBICADO EN LA SUPERFICIE DE UNA CÉLULA Y UNA MOLÉCULA CONJUGADA A FLUORESCÉINA**

25 El diagrama muestra la flexibilidad del brazo anti-fluoresceína “adaptador universal” de DART, así como la posibilidad de sustituir el brazo 2B6 con otras especificidades. Las regiones V se muestran como cuadros, los enlazadores GGGSGGGG se muestran como líneas, el enlace disulfuro se muestra conectando las dos cadenas. Los constituyentes de una cadena se muestran en azul, mientras que el otro es de color rosa. N, extremo amino-terminal; C, extremo carboxi-terminal; FL, fluoresceína, VL, región variable de cadena ligera; VH, región variable de cadena pesada.

30 **FIG. 21 (PANELES A Y B) EL DART 2B6/4420 SE UNE ESPECÍFICAMENTE A MOLÉCULAS CONJUGADAS A FLUORESCÉINA Y PUEDE UNIRSE SIMULTÁNEAMENTE A CD32B**

35 **(A)** Se unieron 2B6/4420 o 2B6/3G8 a placas para ELISA recubiertas con proteína FITC-S. La unión y función del brazo 2B6 se detectaron mediante la unión de CD32B soluble, seguido de un anticuerpo específico de CD32B y un anticuerpo de detección secundario conjugado a HRP. **(B)** 2B6/4420 o 2B6/3G8 se unieron a placas para ELISA recubiertas con HulgG o FITC-HulgG (conjugadas a fluoresceína). Se detectó la unión mediante la unión con un suero policlonal específico de Fv 2B6 seguido de un anticuerpo secundario conjugado a HRP.

40 **FIG. 22 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADOS USANDO ANTICUERPOS ANTI-CD79B HUMANOS**

45 Se activaron linfocitos B purificados usando concentraciones crecientes de los anticuerpos anti-CD79b humano conjugados a FITC, CB3.1-FITC **(A)** o CB3.2-FITC **(B)** y 50 µg/ml del fragmento F(ab')₂ de Fc de IgG GAM específico (eje x). Se activaron linfocitos B en presencia de PBS (barras blancas) o 5 µg/ml de αFITCαCD32BDART (barras negras) o αCD16αCD32BDART (barras grises). Se realizaron las reacciones por triplicado y se calcularon las desviaciones típicas.

50 **FIG. 23 (PANELES A Y B) ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B PURIFICADOS**

Se activaron linfocitos B purificados derivados de un segundo donante sano como se describe en la **FIG. 22, Panel B**. El índice de proliferación se midió en las células activadas en presencia del anticuerpo anti-CD79b conjugado a FITC, CB3.2-FITC **(A)** y se comparó con el índice de proliferación de células activadas en presencia del anticuerpo CB3.2 no marcado **(B)**.

55 **FIG. 24 (Paneles superior e inferior) AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS B MURINOS IN VIVO EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B USANDO MGD261**

60 se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD32^{-/-}-hCD16 A⁺, C57B1/6 mCD32^{-/-} hCD32B⁺ y ratones C57B1/6 mCD32^{-/-}-hCD16A⁺ hCD32B⁺ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales. **Panel superior:** h2B6-3G8 y Acn WNV; **Panel inferior:** ratones h2B6-3G8, -hCD16A o -hCD32B y ratones Acn WNV -hCD16A o -hCD32B.

FIG. 25 AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS B MURINOS *IN VIVO* EN RATONES TRANSGÉNICOS HCD16A/B USANDO DB 2.4G2-3G8

se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-} hCD16A⁺, mCD16^{-/-} hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 el DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón) o PBS. Se recogió la sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

FIG. 26 DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE MGD261 USANDO UN MODELO INTRAVENOSO (IV) DE LA LÍNEA DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS RAJI

Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-} de doce a veinte semanas de vida de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en el día 0 5×10^6 células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 µg de MGD261 o con PBS (control negativo). Después se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores fueron sacrificados.

FIG. 27 EXPRESIÓN DE DART EN HOSPEDADOR NO MAMÍFERO

Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) *T7-lac+* 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a la ampicilina para sembrar un caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó las 0,5 unidades de DO a 600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30 °C durante 2 horas y se recogió medio libre de células.

FIG. 28 ELISA DE DART

Se realizaron ELISA de unión a DART h3G8-h3G8 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Tras la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 29 MUERTE DE LINFOCITOS B HUMANOS INDUCIDA POR DART

Se incubaron células PBMC humanas durante la noche con las moléculas indicadas. Se ensayó la apoptosis mediante análisis de FACS como el porcentaje de la población PI⁺anexina-V⁺ de linfocitos B (linfocitos CD20⁺) en la población total no regulada por FSC/SSC.

FIG. 30 CONSTRUCCIONES DE DART 8B5-CB3.1

Se produjeron múltiples construcciones de DART 8B5-CB3.1 para ilustrar la presente invención. Las construcciones 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, los plásmidos de expresión codificados se cotransfectaron en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin marcador anti-flag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

FIG. 31 ELISA DE DART 8B5-CB3.1

Se realizaron ELISA de competencia de DART 8B5-CB3.1/ch8B5 usando placas Maxisorp de 96 pocillos. Tras la reacción, se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03.

FIG. 32 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE DART TETRAVALENTE

Se ilustra la estructura general de una especie de DART producida mediante el ensamblaje de cuatro cadenas polipeptídicas. Los cuatro dominios de unión al antígeno del DART de tipo Ig se muestran como elipses rayadas y de color gris oscuro.

FIG. 33 DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

Se proporciona un esquema de los sitios de unión al epítopo de un DART tetravalente de tipo Ig.

FIG. 34 ELISA DE UNIÓN DE mCD32-hCD16A

Se proporcionan los resultados de ELISA que demuestran que las especies de DART tetravalentes de tipo Ig del **Ejemplo 6.10** se unen a antígeno con mayor afinidad que el anticuerpo de control (Acm ch-mCD32) u otras especies

de DART.

FIG. 35 DEMOSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS MOLÉCULAS DE DART de tipo Ig

5 Se proporciona un esquema de las moléculas de DART de tipo Ig. La especificidad se indica mediante regiones sombreadas, con un patrón o de color blanco, las regiones constantes se indican en negro y los enlaces disulfuro se indican mediante líneas negras punteadas. Los extremos N-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte superior de la figura, mientras que los extremos C-terminales de todas las cadenas de proteína están orientados hacia la parte inferior de la figura. Las ilustraciones A-E son biespecíficas y las ilustraciones F-J son trispecíficas. Las ilustraciones A y E son tetravalentes. Las ilustraciones B, C, F, I y J son hexavalentes. Las ilustraciones D, G y H son octavalentes. Para ver los detalles de las descripciones de cada uno de los dominios, véanse las Figuras 1, 2, 9, 14 y 17, y el apartado 3.1.

5. Descripción de las realizaciones preferidas

15 Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo contiene un dominio VL y un dominio VH, que se unen de manera covalente de modo que se impide el autoensamblaje de los dominios. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos apareamientos VL-VH, formando dos sitios de unión al epítipo, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio VH ni el VL están restringidos a una posición dentro de la cadena polipeptídica, es decir, restringidos al extremo amino (N)-terminal o al extremo carboxi (C)-terminal, ni los dominios están restringidos a sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede ser N-terminal respecto al dominio VH y viceversa. La única restricción es que haya una cadena polipeptídica complementaria disponible para formar el diacuerpo funcional. Cuando los dominios VL y VH se derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas. Por ejemplo, cuando los dominios de unión se derivan de un anticuerpo específico del epítipo A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción VL_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo producirá la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, dando lugar a un anticuerpo monoespecífico bivalente. Cuando los dominios VL y VH se derivan de anticuerpos específicos para diferentes antígenos, la formación de un diacuerpo biespecífico funcional requiere la interacción de dos cadenas polipeptídicas diferentes, es decir, la formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena polipeptídica comprenderá un dominio VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena dará lugar a la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B, bien de no unión o de unión impredecible. Por el contrario, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes tienen libertad para interactuar, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, comprendiendo una un VL_A y un VH_B y comprendiendo la otra un VL_B y un VH_A, se formaran dos sitios de unión distintos: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas de diacuerpos, la posibilidad de desalineamiento o la ausencia de unión de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, la interacción de los dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de los diacuerpos funcionales se controla fácilmente basándose en la inmunoespecificidad del sitio de unión adecuadamente dimerizado usando cualquier método basado en la afinidad conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

40 Una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo preferentemente se dimerizan, dando lugar a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta propiedades de tipo inmunoglobulina, por ejemplo, interacciones Fc-FcγR. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, compuestos por dos cadenas polipeptídicas, que comprenden cada una un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas polipeptídicas da lugar a un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la del anticuerpo bivalente no modificado (**FIG. 11**). Dichas moléculas de diacuerpo presentarán fenotipos modificados con respecto a la inmunoglobulina de tipo silvestre, por ejemplo, semivida en suero modificada, propiedades de unión modificadas, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', es decir, una cadena polipeptídica que comprende un dominio VL, un dominio VH y un dominio Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', es decir, cadena polipeptídica que comprende un dominio VL y un dominio VH. Las cadenas más ligeras y más pesadas interactúan para formar un monómero, y dichos monómeros interactúan a través de sus dominios Fc no apareados para formar una molécula de tipo Ig. Dicho diacuerpo de tipo Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

60 Los al menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer los mismos epítopos o diferentes. Epítopos diferentes pueden ser del mismo antígeno o epítopos de diferentes antígenos. En una realización, los epítopos son de diferentes células. En otra realización, los epítopos son antígenos de superficie celular de la misma célula o del mismo virus. Los sitios de unión a los epítopos pueden reconocer cualquier antígeno frente al que se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas víricas, fármacos, etc. En aspectos particulares, al menos un sitio de unión al epítipo del diacuerpo es específico de un antígeno en una determinada célula, tal como un linfocito B o un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citolítico natural (NK) o una célula dendrítica.

65 Cada dominio de la cadena polipeptídica del diacuerpo, es decir, el dominio VL, VH y FC puede estar separado por

un enlazador peptídico. El enlazador peptídico puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la secuencia enlazadora de aminoácidos es GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico (**SEQ ID NO: 76**).

5 En determinadas realizaciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo se modifica por ingeniería para que comprenda al menos un resto de cisteína que interaccione con un homólogo en al menos un resto de cisteína de una segunda cadena polipeptídica de la invención para formar un enlace disulfuro entre cadenas. Dichos enlaces disulfuro entre cadenas servirán para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación de los sistemas recombinantes, dando lugar a una formulación estable y sistemática, así como a la mejora de la estabilidad del producto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho al menos un resto de cisteína puede introducirse como un solo aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos mayor, por ejemplo, dominio bisagra, en cualquier parte de la cadena polipeptídica. En una realización específica, dicho al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra realización, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio bisagra, por ejemplo, **SEQ ID NO:1** o **SEQ ID NO:4**. En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio bisagra de IgG, por ejemplo, **SEQ ID NO:1**. En otra realización, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO: 80**). En otras realizaciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (**SEQ ID NO: 17**), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO: 78**). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (**SEQ ID NO: 17**), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO: 78**). En otras realizaciones más, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC (**SEQ ID NO:23**), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO: 77**). En una realización específica, el extremo C-terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (**SEQ ID NO: 77**).

En determinadas realizaciones, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos LGGC y están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre los restos de cisteína de dichas secuencias LGGC. En otra realización específica, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, una de las cuales comprende la secuencia FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), mientras que la otra comprende un dominio bisagra (que contiene al menos un resto de cisteína), en la que dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están unidas de manera covalente por un enlace disulfuro entre el resto de cisteína de FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**) y un resto de cisteína en el dominio bisagra. En aspectos particulares, el resto de cisteína responsable del enlace disulfuro ubicado en el dominio bisagra es Cys-128 (según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat EU; ubicado en el dominio bisagra de una cadena pesada de IgG intacta, no modificada) y el resto de cisteína homólogo en SEQ ID NO: 23 es Cys-214 (según la numeración de acuerdo con el sistema Kabat EU; ubicado en el extremo C-terminal de una cadena ligera de IgG intacta, no modificada) (Elkabetz *et al.* (2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains", *J. Biol. Chem.* 280:14402-14412). En otras realizaciones más, el al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos. En aún otras realizaciones, el al menos un resto de cisteína se modifica por ingeniería para que se encuentre en la parte enlazadora de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En otras realizaciones, el dominio VH o VL se modifica por ingeniería para que comprenda al menos una modificación de aminoácidos respecto al dominio VH o VL precursor, de modo que la modificación de aminoácidos comprenda una sustitución de un aminoácido precursor por cisteína.

La invención engloba moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc o parte del mismo (por ejemplo, un dominio CH2 o dominio CH3). El dominio Fc o parte del mismo puede derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En las realizaciones preferidas, el dominio Fc (o parte del mismo) se deriva de IgG. En realizaciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los mismos. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, dominio Fc que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 seleccionados de manera independiente a partir de cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3 derivado de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). Dicho dominio Fc puede modificarse por ingeniería para dar una cadena polipeptídica que comprenda una molécula de diacuerpo de la invención en cualquier posición respecto a otros dominios o partes de dicha cadena polipeptídica (por ejemplo, el dominio Fc o parte del mismo, puede ser C-terminal para ambos dominios VL y VH del polipeptido de la cadena; puede ser N-terminal para los dominios VL y VH; o puede ser N-terminal para un dominio y C-terminal para el otro (es decir, entre dos dominios de la cadena polipeptídica)).

65 La presente invención también engloba moléculas que comprenden un dominio bisagra. El dominio bisagra puede

derivarse de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina, incluyendo IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En las realizaciones preferidas, el dominio bisagra se deriva de IgG, en el que el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de los mismos. Dicho dominio bisagra puede modificarse por ingeniería para dar una cadena polipeptídica que comprenda la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de modo que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio bisagra-Fc. En determinadas realizaciones, el dominio bisagra y Fc se seleccionan independientemente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento. En otras realizaciones, el dominio bisagra y Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, por ejemplo, el dominio VL. El dominio bisagra, u opcionalmente, el dominio bisagra-Fc, pueden modificarse por ingeniería para dar un polipéptido de la invención en cualquier posición respecto a otros dominios o partes de la cadena polipeptídica. Además, se describe una cadena polipeptídica que comprende un dominio bisagra, dominio bisagra que está en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica, en el que dicha cadena polipeptídica no comprende un dominio Fc. En otras realizaciones más, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio bisagra-Fc, dominio bisagra-Fc que está en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. En otras realizaciones, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio bisagra-Fc, dominio bisagra-Fc que está en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica.

Como se ha analizado anteriormente, la invención engloba multímeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de sus cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinados aspectos, las cadenas polipeptídicas de los multímeros contienen además un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc conducen a la formación de una molécula de diacuerpo que presenta funcionalidad de tipo inmunoglobulina, es decir, función mediada por Fc (por ejemplo, la interacción Fc-FcγR, unión del complemento, etc.). En determinadas realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen la misma especificidad, y la molécula de diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen diferente especificidad y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En otras realizaciones más, las moléculas de diacuerpo de la invención engloban tetrámeros de las cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de sus cadenas polipeptídicas un dominio VH y VL. En determinadas realizaciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero comprenden además un dominio Fc. Por tanto, el tetrámero está se compone de dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', que comprenden cada una un dominio VL, un dominio VH y un dominio Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y una más ligera para dar un monómero bivalente acoplado con la dimerización de dichos monómeros a través de los dominios Fc de las cadenas más pesadas dará lugar a la formación de una molécula de tipo inmunoglobulina tetravalente (ilustrada en el Ejemplo 6.2 y el Ejemplo 6.3). En ciertos aspectos, los monómeros son los mismos y la molécula de diacuerpo tetravalente es monoespecífica o biespecífica. En otros aspectos, los monómeros son diferentes y la molécula tetravalente es biespecífica o tetraespecífica.

La formación de una molécula de diacuerpo tetraespecífica como se ha descrito anteriormente requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Es difícil lograr dichas interacciones de manera eficaz en un solo sistema de producción recombinante celular, debido a las múltiples variantes de los posibles apareamientos erróneos de las cadenas. Una solución para aumentar la probabilidad de apareamientos erróneos es modificar por ingeniería mutaciones de tipo "botón en ojal" en los pares de cadenas polipeptídicas deseadas. Dichas mutaciones favorecen la heterodimerización frente a la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones Fc-Fc, puede introducirse una sustitución de aminoácidos (preferentemente, una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un 'botón', por ejemplo, triptófano) en el dominio CH2 o CH3 para que una interferencia estérica impida la interacción con un dominio igualmente mutado y obligue al dominio mutado a aparearse con un dominio en el que se haya modificado por ingeniería una mutación complementaria o de alojamiento, es decir, el 'ojal' (por ejemplo, una sustitución con glicina). Dichas series de mutaciones pueden modificarse por ingeniería en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo, y además, modificarse en cualquier parte de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los métodos de modificación por ingeniería de proteínas para favorecer la heterodimerización frente a la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular, con respecto a la modificación por ingeniería de moléculas de tipo inmunoglobulina, y están englobados en el presente documento (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.* (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", *Protein Eng.* 9: 617-621, Atwell *et al.* (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, y Xie *et al.* (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", *J. Immunol. Methods* 296:95-101).

Además, se describen moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc variantes o bisagra-Fc variantes (o partes de los mismos), dominio Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustitución, inserción, eliminación) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre o dominio bisagra-Fc comparable (o parte de los mismos). Las moléculas que comprenden dominios Fc o bisagra-Fc variantes (o partes de los mismos) (por ejemplo, anticuerpos) normalmente tienen fenotipos modificados con respecto a las moléculas que contienen dominios Fc o dominios bisagra-Fc de tipo silvestre o partes de los mismos. El fenotipo variante se puede expresar como semivida en suero modificada, estabilidad modificada, susceptibilidad modificada a enzimas celulares o función efectora modificada según lo determinado en un ensayo dependiente de linfocitos NK o dependiente de macrófagos. En la solicitud internacional WO 04/063351, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. 2005/0037000,

2005/0064514, 2006/0134709 y 2006/0177439, se desvelan variantes del dominio Fc identificadas como aquellas que alteran la función efectora.

Los diacuerpos biespecíficos de la invención pueden unir al mismo tiempo dos epítomos distintos e independientes. En ciertas realizaciones, los epítomos son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítomos son de antígenos diferentes. En las realizaciones preferidas, al menos un sitio de unión al epítomo es específico de un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresan en linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales (NK) u otras células mononucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une al determinante de células efectoras y también activa dicha célula efectora. En este sentido, las moléculas de diacuerpo de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo Ig independientemente de si estas comprenden además un dominio Fc (por ejemplo, según lo ensayado en algún ensayo de la función efectora conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento (por ejemplo, ensayo ADCC). En ciertas realizaciones, el diacuerpo biespecífico de la invención se une tanto a un antígeno del cáncer en una célula tumoral como a un determinante de células efectoras mientras activa dicha célula. En realizaciones alternativas, el diacuerpo o la molécula de diacuerpo biespecíficos de la invención puede inhibir la activación de una célula diana, por ejemplo, efectora, uniendo al mismo tiempo y así enlazando, un receptor activador e inhibidor en la misma célula (por ejemplo, una CD32A y CD32B, BCR y CD32B, o IgERI y CD32B) como se ha descrito anteriormente (véase, el apartado de Antecedentes). En otro aspecto de dicha realización, el diacuerpo biespecífico puede presentar propiedades antivíricas uniendo simultáneamente dos epítomos neutralizantes en un virus (por ejemplo, epítomos de VRS; epítomos de WNV tales como E16 y E53).

En determinadas realizaciones, las moléculas de diacuerpo biespecíficas de la invención ofrecen oportunidades únicas para dirigirse a tipos de células específicas. Por ejemplo, el diacuerpo o la molécula de diacuerpo biespecíficos puede modificarse por ingeniería para comprender una combinación de sitios de unión al epítomo que reconozcan una serie de antígenos únicos frente a un tipo de célula o tejido diana. Además, cuando cualquiera o ambos antígenos individuales esté/n normalmente separados en otros tipos de tejido y/o célula, es posible usar dominios de unión de baja afinidad con el fin de construir el diacuerpo o la molécula de diacuerpo. Dichos dominios de unión de baja afinidad serán incapaces de unirse al epítomo o antígeno con suficiente avidéz con fines terapéuticos. Sin embargo, cuando están presentes epítomos o antígenos en una sola célula o tejido diana, la avidéz del diacuerpo o la molécula de diacuerpo hacia la célula o el tejido, con respecto a la célula o al tejido que expresa solo uno de los antígenos, aumentará de modo que la célula o el tejido pueda seleccionarse como diana de manera eficaz mediante la invención. Dicha molécula biespecífica puede presentar una mejor unión a uno o ambos de sus antígenos diana en células que expresen dichos antígenos con respecto a un diacuerpo monoespecífico o un anticuerpo con una especificidad solo hacia uno de los antígenos.

Preferentemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la invención se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones de células efectoras del mediador FcγR (mediadas a través de interacciones Fc-FcγR o mediante la unión inespecífica de una molécula de diacuerpo a un FcγR) (véanse los apartados 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas, por ejemplo, diacuerpos, de la invención hacia un FcγR se pueden determinar usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones entre dominio de unión-antígeno o Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un antígeno a un dominio de unión o la unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, pero sin limitación, ensayo de ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayo de inmunoprecipitación (véase el apartado 5.4.2). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y desvelados en el presente documento) como aquellos ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye moléculas de la invención que no presenten el fenotipo deseado en los ensayos, pero que presenten el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se modifican por ingeniería para que comprendan un patrón de glicosilación modificado o una glicofoma modificada con respecto a la parte comparable de la molécula molde. Las glicofomas modificadas por ingeniería pueden ser útiles para diversos fines, incluyendo, pero sin limitación, mejorar la función efectora. Las glicofomas modificadas por ingeniería se pueden generar mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, usando cepas modificadas por ingeniería o de expresión variable, mediante la expresión conjunta con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), mediante la expresión de un diacuerpo de la invención en diversos organismos o estirpes celulares de diversos organismos, o modificando el/los hidrato/s de carbono después de que el diacuerpo haya sido expresado y purificado. Los métodos para generar glicofomas modificadas por ingeniería son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, las descritas en Umana *et al.* (1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity", *Nat. Biotechnol* 17:176-180; Davies *et al.* (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: "Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII", *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields *et al.* (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human FcγR III And Antibody-Dependent Cellular Toxicity", *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa *et al.* (2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity", *J Biol Chem* 278:3466-3473), documentos US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT

WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMab™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Véase, por ejemplo, documentos WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki *et al.* (2004) "Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And FcGammaRIIIA", *JMB*, 336: 1239-49.

La divulgación engloba además la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la invención. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia, tales como los que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas, véase, por ejemplo, Wang *et al.* (2002) "Expanding The Genetic Code", *Chem. Comm.* 1: 1-11; Wang *et al.* (2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli", *Science*, 292: 498-500; van Hest *et al.* (2001) "Protein-Based Materials", Toward A New Level Of Structural Control", *Chem. Comm.* 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang *et al.* (2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroisoleucine In An Engineered Bacterial Host", *J. Am. Chem. Soc.* 123(44): 11089-11090; Kiick *et al.* (2001) "Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli", *FEBS Lett.* 502(1-2):25-30.

En algunas realizaciones, la divulgación engloba métodos para modificar un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la invención mediante la adición o eliminación de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el hidrato de carbono de proteínas son bien conocidos en la técnica y están englobados dentro de la invención, véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.218.149; documento EP 0 359 096 B1; la publicación de EE.UU. n.º US 2002/0028486; documento WO 03/035835; publicación de EE.UU. n.º 2003/0115614; patente de EE.UU. n.º 6.218.149; patente de EE.UU. n.º 6.472.511.

5.1 DOMINIOS DE UNIÓN A DIACUERPOS

Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios de unión al antígeno generalmente derivados de inmunoglobulinas o anticuerpos. Los anticuerpos de los que se derivan los dominios de unión usados en los métodos de la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, ser humano, primate no humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo). Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulinas humanas, sintéticas o de ratones que expresen anticuerpos de genes humanos.

La divulgación contempla el uso de cualquiera de los anticuerpos conocidos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias o enfermedades infecciosas como fuente de dominios de unión para los diacuerpos de la invención. Los ejemplos no limitantes de los anticuerpos del cáncer conocidos se proporcionan en el apartado 5.7.1, así como otros anticuerpos específicos para los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos del cáncer enumerados en el apartado 5.6.1; los ejemplos no limitantes de los anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad autoinmune y enfermedad inflamatoria se proporcionan en el apartado 5.7.2., así como anticuerpos contra antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en el apartado 5.6.2; en otras realizaciones, es posible usar anticuerpos contra epítomos asociados con enfermedades infecciosas como se enumera en el apartado 5.6.3. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que se han identificado mediante los métodos de la invención con una función efectora conferida y/o afinidad potenciada por el FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo silvestre. Un ejemplo no limitantes de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que se pueden modificar por ingeniería de acuerdo con la invención se presenta en la **Tabla 9**, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunes se presenta en la **Tabla 10**.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de los anticuerpos en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, se puede preferir el uso de diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos anteriormente descritos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes de EE.UU. n.º 4.444.887 y 4.716.111; las publicaciones internacionales n.º WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento del mismo, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco conservada que tiene esencialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana o una CDR que tiene esencialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede comprender esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR

corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o esencialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Las regiones marco conservadas y las CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder exactamente a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR donante o la región marco conservada consenso pueden mutagenizarse mediante la sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto para que la CDR o resto marco de ese sitio no corresponda a la secuencia consenso o al anticuerpo donante. Dichas mutaciones, sin embargo, preferentemente no son extensas. Normalmente, al menos el 75 % de los restos de los anticuerpo humanizados corresponderán con los de la región marco conservada (FR) precursora y las secuencias CDR, más frecuentemente el 90 %, y lo más preferentemente más del 95 %. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el injerto de CDR (patente europea n.º EP 239400; la publicación internacional n.º WO 91/09967; y las patentes de EE.UU. n.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), sustitución en superficie o acondicionamiento de la superficie (patentes europeas n.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan (1991) "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties", *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.* (1994) "Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues", *Protein Engineering* 7(6):805-814; y Roguska *et al.* (1994) "Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing", *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91:969-973), redistribución de cadenas (patente de EE.UU. n.º 5.565.332), y técnicas desveladas en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, la publicación internacional n.º WO 9317105, Tan *et al.* (2002) "Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28", *J. Immunol.* 169: 1119-25, Caldas *et al.* (2000) "Design And Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD18 Surface Antigen", *Protein Eng.* 13:353-60, Morea *et al.* (2000) "Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design", *Methods* 20:267-79, Baca *et al.* (1997) "Antibody Humanization Using Monovalent Phage Display", *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84, Roguska *et al.* (1996) "A Comparison Of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing", *Protein Eng.* 9:895-904, Couto *et al.* (1995) "Designing Human Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates", *Cancer Res.* 55 (23 Sup):5973s-5977s, Couto *et al.* (1995) "Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In Vitro Characterization" *Cancer Res.* 55: 1717-22, Sandhu (1994) "A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies", *Gene* 150:409-10, Pedersen *et al.* (1994) "Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization Of Murine Antibodies", *J. Mol. Biol.* 235: 959-973, Jones *et al.* (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse" *Nature* 321:522-525, Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", *Nature* 332:323-327, y Presta (1992) "Antibody Engineering", *Curr. Op. Biotech.* 3(4):394-398. A menudo, los restos marco de las regiones marco conservadas serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y de la región marco conservada para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en posiciones específicas. (Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.585.089; publicaciones de EE.UU. n.º 2004/0049014 y 2003/0229208; patentes de EE.UU. n.º 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101, y Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", *Nature* 332:323-327).

En la realización más preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo murino donante. Los expertos en la materia apreciarán que la invención engloba el injerto de CDR de los anticuerpos en general. Por lo tanto, los anticuerpos donantes y aceptores pueden derivarse de animales de la misma especie e incluso de la misma clase o subclase de anticuerpo. Más habitualmente, sin embargo, los anticuerpos donantes y aceptores se derivan de animales de diferente especie. Por lo general, el anticuerpo donante es un anticuerpo no humano, tal como puede ser un Acm de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, al menos una CDR del anticuerpo donante se injerta en el anticuerpo humano. En otras realizaciones, al menos dos y, preferentemente, las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de bucles estructurales o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la invención engloba un anticuerpo contra FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada a la que se injerta la CDR y al menos una cadena ligera a la que se injerta la CDR.

Los diacuerpos usados en los métodos de la invención incluyen derivados que son modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, aunque no de forma limitante, los derivados de diacuerpos incluyen diacuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no convencionales.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina tal como pueden ser anticuerpos que tengan una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison (1985) "Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies", *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) "Chimeric Antibodies", *BioTechniques* 4:214-221; Gillies *et al.* (1989) "High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes", *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y las patentes de EE.UU. n.º 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

A menudo, los restos marco de las regiones marco conservadas serán sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y de la región marco conservada para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en posiciones específicas. (Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 5.585.089; y Riechmann *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy", *Nature* 332:323-327).

Los anticuerpos monoclonales a partir de los que pueden prepararse los dominios de unión de los anticuerpos de la invención usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pág. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva a partir de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y examinar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, es posible inmunizar ratones con un antígeno de interés o una célula que exprese dicho antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, los anticuerpos específicos para el antígeno se detectan en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación, se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas a cualquiera de las células de mieloma apropiadas. Se seleccionan y se clonan los hibridomas por dilución limitante. Los clones de hibridomas se someten luego a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para determinar células que secreten anticuerpos capaces de unirse al antígeno. Se puede generar líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inoculando ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, pero sin limitación, antígenos asociados con los cánceres proporcionados en el apartado 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias proporcionadas en el apartado 5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas proporcionadas en el apartado 5.8.3, y las toxinas proporcionadas en el apartado 5.8.4.

También es posible generar anticuerpos usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo son presentados en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago puede usarse para presentar dominios de unión al antígeno, tal como el fragmento Fab y Fv o Fv estabilizado con enlaces disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos normalmente son fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión al antígeno son expresados como proteína fusionada de forma recombinante a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkmann *et al.* (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames *et al.* (1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins", *J. Immunol. Methods*, 184:177-186; Kettleborough *et al.* (1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments", *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958; Persic *et al.* (1997) "An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries", *Gene*, 187:9-18; Burton *et al.* (1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries", *Advances in Immunology*, 57:191-280; solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; documento WO 91/10737; documento WO 92/01047; documento WO 92/18619; documento WO 93/11236; documento WO 95/15982; documento WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. n.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, conocida como maduración por afinidad,

emplea la mutagénesis o el paseo por las CDR y la reelección usando el antígeno relacionado para identificar los anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) "Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody", *J. Immunology* 149:2607-2614). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos simples produce un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Es posible construir bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes, cada uno de los cuales difiere en modificaciones de un solo aminoácido en una sola CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto CDR. Los mutantes con mayor afinidad de unión por el antígeno pueden explorarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Se puede usar cualquier método de rastreo conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor afección por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase Wu *et al.* (1998) "Stepwise In vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alpha Beta3-Specific Humanized mAb", *Proc Natl. Acad Sci. EE.UU.* 95:6037-6042; Yelton *et al.* (1995) "Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis", *J. Immunology* 155:1994-2004). También es posible el paseo por las CDR que asigna al azar la cadena ligera (véase Schier *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site", *J. Mol. Bio.* 263:551-567).

La presente divulgación también engloba el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión que se describen en el presente documento o que se conocen en la técnica con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco conservadas o CDR. Preferentemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la afección y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen de manera inmuno-específica. Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) se pueden usar para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno específico.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que producen sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos realizadas en uno o más de los restos de aminoácidos no esenciales previstos.

5.1.1 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN SITIOS DE UNIÓN AL EPÍTOPO QUE SE UNEN DE MANERA INMUNOESPECÍFICA A FcγRIIB

En una realización particular, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la invención es agonista hacia al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización de la invención, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión inhibe la activación de linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular de linfocitos B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de la señalización cadena abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización más, el dominio de unión potencia la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la invención, el dominio de unión inhibe la actividad de MAP quinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión es agonista de la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión de la invención estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de los miembros de la familia de las MAP quinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, INK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión de la invención potencian la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la invención inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra realización, los dominios de unión antagonizan al menos una actividad de FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En una realización particular, los dominios de unión potencian la actividad de los linfocitos B, la proliferación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización cadena abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra realización particular más, los dominios de unión disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una realización adicional de la invención, los dominios de unión potencian la actividad de MAP quinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de linfocitos B. En otra realización, los dominios de unión son antagonistas de la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una realización particular, los dominios de unión potencian la activación de mastocitos inducida por FcεRI, la movilización del calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, potencian la activación de los miembros de la familia de las MAP quinasas (por ejemplo, Erk1, Erk2, INK, p38, etc.). En otra realización más, los

dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosinas de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra realización, los dominios de unión potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra realización, los dominios de unión impiden la fagocitosis, el aclaramiento de partículas opsonizadas por macrófagos esplénicos.

5 En otras realizaciones, al menos uno de los dominios de unión puede usarse para dirigir los diacuerpos de la invención a células que expresen FcγRIIB.

10 En una realización particular, uno de los dominios de unión se deriva de un anticuerpo monoclonal murino producido por el clon 2B6 o 3H7, que tiene números de registro ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas productores de anticuerpos 2B6 y 3H7 se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de los procedimientos en materia de patentes, y los números de registro asignados PTA-4591 (para el hibridoma productor de 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma productor de 3H7). En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o han sido humanizados, preferentemente se derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

20 La divulgación también engloba diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente a FcγRIIB, preferentemente FcγRIIB humano, más preferentemente FcγRIIB humano, nativo, que se derivan de clones que incluyen, pero sin limitación, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas productores de los clones anteriormente identificados fueron depositados en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En las realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos anteriormente descritos están humanizados.

25 En una realización específica, los dominios de unión que se usan en los diacuerpos de la presente invención son de un anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferentemente, las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización, el dominio de unión se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente y/o compite con el anticuerpo monoclonal murino producido a partir del clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una afinidad superior a la del dominio de unión a FcγRIIA.

35 La presente divulgación también engloba diacuerpos con dominios de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La presente invención engloba además diacuerpos con dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de lo que se une el anticuerpo o fragmento del mismo a FcγRIIA, y que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR que es al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, incluyendo las búsquedas de proteínas BLAST.

50 La presente divulgación también engloba el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de lo que el dominio de unión se une a FcγRIIA, que son codificados por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprende una cadena ligera variable y/o cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que FcγRIIA, y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero sin limitación, hibridación a ADN unido al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) x6 a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC x0,2/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C, condiciones altamente rigurosas tales como la hibridación a ADN unido al filtro en SSC x6 a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC x0,1/SDS al 0,2 % a aproximadamente 60 °C, u cualquier otra condición rigurosa de hibridación conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, ed. 1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY, en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

La presente divulgación también engloba el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión que se describen anteriormente con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco conservadas o CDR. Preferentemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidéz y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB al que se unen de manera inmuno-específica. Se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para determinar la afinidad de un anticuerpo por un determinado antígeno.

Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que producen sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos con respecto al anticuerpo original o fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos realizadas en uno o más de los restos de aminoácidos no esenciales previstos.

En las realizaciones preferidas, los dominios de unión se derivan de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo específico FcγRIIB humanizado puede comprender esencialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o esencialmente todas las regiones marco conservadas son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios variables humanizados específicos para FcγRIIB en los que una o más regiones de una o más CDR de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano (el anticuerpo receptor) han sido sustituidas por partes análogas de una o más CDR de un anticuerpo monoclonal donante que se une específicamente a FcγRIIB, con una afinidad mayor que FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítipo que 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2, respectivamente.

En una realización preferida, las regiones CDR del dominio de unión a FcγRIIB humanizado se derivan de un anticuerpo murino específico de FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento comprenden alteraciones, incluyendo, pero sin limitación, eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, del anticuerpo receptor, es decir, regiones marco conservadas de dominio variable de cadena pesada y/o ligera, humanas, que son necesarias para conservar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donante. En algunas realizaciones, las regiones marco conservadas de los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos exacta de la región marco conservada de una región variable del anticuerpo humano natural, sino que contiene diversas modificaciones, incluyendo, pero sin limitación, eliminaciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos que modifican la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, que mejoran las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica de la misma diana que el anticuerpo específico de FcγRIIB murino. En las realizaciones más preferidas, se realiza una cantidad mínima de modificaciones en la región marco conservada con el fin de evitar introducciones a gran escala de restos marco no humanos y para garantizar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en los seres humanos. El anticuerpo monoclonal donante preferentemente es un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

En una realización específica, el dominio de unión engloba los dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que se une el anticuerpo a FcγRIIA, en la que el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende restos marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donante, que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra realización específica, los diacuerpos de la invención comprenden dominios variables de un anticuerpo con injerto de CDR que se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, en la que el anticuerpo con injerto de CDR comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende restos marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donante, que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad de la que el anticuerpo se une a FcγRIIA, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

Los dominios variables anti-FcγRIIB humanizados usados en la invención pueden tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:25) y/o CDR2 (SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27) y/o CDR3 (SEQ ID NO:28 o SEQ ID NO:29) y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 (SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33) y/o una CDR2 (SEQ ID NO:34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:37) y/o CDR3 (SEQ ID NO:38 o SEQ ID NO:39).

En una realización específica, el diacuerpo comprende los dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en el que la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana VH1-18 (Matsuda *et al.* (1998) "The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus",

Plásmido	Receptor	Extremo N-terminal	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C-terminal
pMGX127		Ila	QKFSRLDPT	47	APS-----SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	48	APS-----SS (IIb)
pMGX129		Ila	QKFSHLDPT	49	APS-----SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	50	APS-----SS (IIb)
pMGX131		Ila	QKFSRLDPN	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	Ila	QKFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	Ila	QKFSHLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSRLDPT	55	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFSHLDPT	56	VPSMGSSS(IIa)

Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para determinar la unión de un anticuerpo anti-FcγRIIB de la invención, por ejemplo, un ensayo ELISA. En otras realizaciones, es posible realizar una confirmación adicional de la especificidad por el epítipo usando péptidos con restos específicos reemplazados por los de la secuencia de FcγRIIA.

Los anticuerpos se pueden caracterizar mediante ensayos para identificar la función de los anticuerpos de la invención, en particular, la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización de la invención pueden medir la fosforilación de los restos de tirosina del motivo ITIM de FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de linfocitos B. Los ensayos de caracterización de la invención pueden ser ensayos a base de células o libres de células.

Se ha establecido bien en la técnica que, en los mastocitos, la agregación conjunta de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, conduce a la inhibición de la desgranulación, la movilización de calcio y la producción de citocinas inducidas por el antígeno (Metcalf D. D. *et al.* (1997) "Mast Cells", *Physiol. Rev.* 77: 1033-1079; Long E. O. (1999) "Regulation Of Immune Responses Through Inhibitory Receptors", *Annu. Rev. Immunol.* 17: 875-904). Los detalles moleculares de esta vía de señalización se han dilucidado recientemente (Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcγRIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling", *J. Immunol.* 162(9):4430-4439). Una vez agregado junto con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en tirosina en su motivo ITIM, y luego recluta inositol-5-fosfatasa que contiene la homología de Src-2 (SHIP), una inositol polifosfato 5-fosfatasa que contiene el dominio SH2, que, a su vez, se fosforila y se asocia con Shc y p62^{dok} (p62^{dok} es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras que incluye dominios de señalización, tales como un dominio de homología de pleckstrina amino-terminal (dominio PH), un dominio PTB, y una región carboxi-terminal que contiene motivos PXXP y numerosos sitios de fosforilación (Carpino *et al.* (1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells", *Cell*, 88: 197-204; Yamanshi *et al.* (1997) "Identification Of The Abl-And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok", *Cell*, 88:205-211).

Los anticuerpos anti-FcγRIIB que se usan en la invención del mismo modo se pueden caracterizar por su capacidad para modular una o más respuestas mediadas por IgE. Preferentemente, se usarán las estirpes celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad por IgE y el receptor de baja afinidad por FcγRIIB con el fin de caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB para modular las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, se usarán células de una estirpe celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E. L. *et al.* (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones", *Eur. J. Immunol.* 11:317-323) transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una estirpe celular de rata bien caracterizada que se ha usado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización tras la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización del calcio, desgranulación y producción de citocinas inducidas por FcεRI (Malbec *et al.* (1998) "Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Phosphorylation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation", *J. Immunol.* 160:1647-1658; Daeron *et al.* (1995) "Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors", *J. Clin. Invest.* 95:577; Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcγRIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling", *J. Immunol.* 162(9):4430-4439).

Los anticuerpos que se usan en la invención también pueden caracterizarse por su inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI. Por ejemplo, es posible usar células de una estirpe celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E. L. *et al.* (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones", *Eur. J. Immunol.* 11:317-323) que se ha transfectado con FcγRIIB son sensibilizadas con IgE y estimuladas con fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón, para agregar solo FcεRI, o con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón, completos para coagregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas de señalización cadena abajo puede ensayarse tras la adición de anticuerpos de la invención a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, se puede ensayar la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, y el reclutamiento y la fosforilación de SHIP, la activación de los miembros de la familia de las MAP quinasas, incluyendo, pero sin limitación, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosinas de

p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.

Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la activación de los mastocitos inducida por FcεRI mediante los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: transfección de células RBL-H23 con FcγRIIB humano; la sensibilización de las células RBL-H23 con IgE; la estimulación de células RBL-H23 con el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (para agregar solo FcεRI y generar la señalización mediada por FcεRI como control), o la estimulación de células RBL-H23 con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, completo (para agregar FcγRIIB y FcεRI, dando lugar a la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que hayan sido estimuladas con anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón completos además pueden incubarse previamente con los anticuerpos de la invención. La medición de la actividad dependiente de FcεRI de células que se han incubado previamente con los anticuerpos de la invención y las células que no se han incubado previamente con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos de la invención.

El ensayo ilustrativo anteriormente descrito puede, por ejemplo, usarse para identificar anticuerpos que bloqueen la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y antagonice la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Asimismo, este ensayo identifica a los anticuerpos que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcεRI, y son agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI, potenciando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden los dominios de unión al epítipo de los anticuerpos anti-FcγRIIB identificados, descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, de la invención se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE controlando y/o midiendo la desgranulación de los mastocitos o basófilos, preferentemente, en un ensayo a base de células. Preferentemente, los mastocitos o basófilos que se usan en dichos ensayos se han modificado por ingeniería para que contengan FcγRIIB humano usando métodos recombinantes convencionales conocidos por un experto en la materia. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos) a base de células. La liberación de β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un hecho principal en un estado alérgico e inflamatorio (Aketani *et al.* (2001) "Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Degranulation In RBL-2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen- Specific IgEs", *Immunol. Lett.* 75: 185-189; Aketani *et al.* (2000) "A Screening Method For Antigen-Specific IgE Using Mast Cells Based On Intracellular Calcium Signaling", *Anal. Chem.* 72: 2653-2658). Se puede ensayar liberación de otros mediadores inflamatorios, incluyendo, pero sin limitación, la serotonina y la histamina para medir una respuesta mediada por IgE de acuerdo con los métodos de la invención. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, la liberación de los gránulos, tales como aquellos que contienen β-hexosaminidasa a partir de los mastocitos y basófilos es un proceso que depende de la concentración de calcio intracelular, que se inicia mediante la reticulación de los FcγRI con antígenos multivalentes.

La capacidad de estudiar los mastocitos humanos se ha visto limitada por la ausencia de cultivos de mastocitos humanos apropiados a largo plazo. Recientemente, dos nuevas estirpes celulares de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre, denominadas LAD1 y LAD2, fueron establecidas a partir de aspirados de médula ósea de un paciente con leucemia/sarcoma de mastocitos (Kirshenbaum *et al.* (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI or FcγRI", *Leukemia research*, 27:677-82). Se ha descrito que ambas estirpes celulares expresan FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. Las células LAD1 y 2 pueden usarse para evaluar el efecto de los anticuerpos de la invención sobre las respuestas mediadas por IgE. En una realización específica, los ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células, tales como los descritos anteriormente, se pueden usar en células LAD para determinar alguna modulación de la respuesta mediadas por IgE usando los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. En un ensayo ilustrativo, los mastocitos humanos, por ejemplo, LAD1, se sensibilizan con IgE humana quimérica anti-nitrofenol (NP) y se exponen a BSA-NP, el antígeno polivalente, y se controla la desgranulación celular midiendo la β-hexosaminidasa liberada en el sobrenadante (Kirshenbaum *et al.* (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD 1 And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI Or FcγRI", *Leukemia research*, 27:677-82).

En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, determinada usando los métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, la tinción para FACS, puede ser difícil controlar y/o detectar las diferencias en la activación de la vía inhibitoria mediada por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. Así pues, la invención engloba métodos alternativos, con los que se puede regular positivamente la expresión de FcγRIIB usando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que es posible regular positivamente a un alto nivel FcγRIIB en estirpes celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937, (Tridandapani *et al.* (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells", *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop *et al.* (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines", *J. of Immunol.*, 166: 531-537) mediante IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con dibutilil AMP cíclico

aumenta la expresión de FcγRII (Cameron *et al.* (2002) "Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyryl CyclicAMP Induces The Expression Of The Inhibitory Fc Receptor, FcγRIIB", *Immunology Letters* 83, 171-179). De este modo, la expresión endógena de FcγRIIB en mastocitos humanos para usarlos en los métodos de la invención puede regularse positivamente usando citocinas, por ejemplo, IL-4, IL-13, para potenciar la sensibilidad de detección.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para determinar la inhibición de la señalización mediada por el receptor de linfocitos B (BCR). La señalización mediada por BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas cadena abajo, tales como la activación y proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación de FcγRIIB y BCR produce la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Además, la coagregación de FcγRIIB y BCR conduce a la inhibición de la señalización mediada por BCR.

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

Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR están mediadas a través de SHIP, recientemente, se ha demostrado que los linfocitos B activados con lipopolisacárido (LPS) derivados de ratones deficientes en SHIP muestran una inhibición significativa de la movilización del calcio mediada por FcγRIIB, producción de Ins(1,4,5)P3 y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler *et al.* (2001) "Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcγRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells", *Journal of Immunology*, 167(1): 204-211). Por consiguiente, para caracterizar los anticuerpos de la invención, es posible usar linfocitos B *ex vivo* procedentes de ratones deficientes en SHIP. Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR por los anticuerpos de la invención puede comprender lo siguiente: el aislamiento de linfocitos B esplénicos de ratones deficientes en SHIP, la activación de dichos linfocitos con lipopolisacárido y la estimulación de dichos linfocitos con F(ab')₂ anti-IgM para agregar BCR o con anticuerpo anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Los linfocitos que se hayan estimulado con anticuerpo anti-IgM intacto para coagregar BCR con FcγRIIB se pueden incubar previamente además con los anticuerpos de la invención. La actividad de células dependiente de FcγRIIB puede medirse mediante técnicas convencionales conocidas. La comparación del nivel de la actividad dependiente de FcγRIIB en células que han sido previamente incubadas con los anticuerpos, y células que no han sido previamente incubadas, y la comparación de los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIB por los anticuerpos.

La medición de la actividad dependiente de FcγRIIB puede incluir, por ejemplo, la medición de la movilización del calcio intracelular por citometría de flujo, la medición de la fosforilación de Akt y/o Erk, la medición de la acumulación de PI(3,4,5)P3 mediada por BCR o la medición de la proliferación de linfocitos B mediada por FcγRIIB.

Es posible usar ensayos, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anticuerpos anti-FcγRIIB para usarlos en la invención que modulen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR bloqueando el sitio de unión al ligando (IgG) frente al receptor de FcγRIIB y antagonizando la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR impidiendo la coagregación de FcγRIIB y BCR. También se pueden usar los ensayos para identificar anticuerpos que potencien la coagregación de FcγRIIB y BCR y agonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de BCR.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB también se pueden ensayar para determinar la señalización mediada por FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcγRIIB con un receptor portador del motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) actúa para regular a la baja la fagocitosis mediada por FcγR usando SHIP como su efector (Tridandapani *et al.* (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells", *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089). La coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce la rápida fosforilación del resto de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB, dando lugar a una potenciación de la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación de FcγRIIA con FcγRIIB produce la regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina quinasa implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

Los diacuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, las células de una estirpe celular monocítica humana, THP-1 puede estimularse bien con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcγRII y el anticuerpo de cabra anti-ratón (para agregar solo FcγRIIA), o con el anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y el anticuerpo de cabra anti-ratón (para coagregar FcγRIIA y FcγRIIB). En este sistema, la modulación de las moléculas de señalización cadena abajo, tal como la fosforilación de tirosinas de FcγRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, la fosforilación de Akt y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa se puede ensayar tras la adición de moléculas de la invención a las células estimuladas. Además, la eficiencia fagocítica dependiente de FcγRIIB de la estirpe celular monocítica se puede medir directamente en presencia y ausencia de los anticuerpos de la invención.

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

El ensayo ilustrativo que se describe se puede usar, por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA impidiendo la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA. Asimismo, este ensayo identifica los dominios de unión que potencian la coagregación de FcγRIIB y FcγRIIA y sean agonistas de la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

Los dominios de unión a FcγRIIB de interés se pueden ensayar al tiempo que comprenden los anticuerpos midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG marcada con fluoresceína mediante los métodos anteriormente descritos (Tridandapani *et al.* (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcγ Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells", *J. Biol. Chem.* 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ilustrativo para medir la fagocitosis comprende: tratar las células THP-1 con los anticuerpos de la invención o con un anticuerpo de control que no se una a FcγRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en el que la diferencia en las actividades de las células (por ejemplo, la actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubierto con IgG), actividad de adherencia (el número total de SRBC unido a células THP-1) y la tasa fagocítica) indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcγRIIA por los anticuerpos de la invención. Este ensayo se puede usar para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloqueen la unión al ligando del receptor FcγRIIB y antagonicen la inhibición mediada por FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que potencian la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcγRIIA.

En una realización preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos de al menos una o más de las siguientes formas: modulación de moléculas de señalización cadena abajo (por ejemplo, la modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación de SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales de aproximadamente 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

5.1.2 DOMINIOS DE UNIÓN A CD16A

El siguiente apartado analiza las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse como fuentes para las regiones variables de cadena ligera y pesada para la producción de diacuerpos covalentes. En la presente invención, las proteínas de unión a CD16A incluyen moléculas que contienen los dominios VL y VH de los anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se usan para la producción de los diacuerpos de la presente invención.

Se pueden usar diversas proteínas de unión a CD16A en relación con la presente invención. Las proteínas de unión a CD16A adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como fragmentos de anticuerpos de unión a CD16A (por ejemplo, scFv o anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas de tipo anticuerpo que se unen a CD16A mediante una interacción con un dominio de región variable de cadena ligera, un dominio de región variable de cadena pesada, o ambos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a CD16A para su uso de acuerdo con la invención comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con secuencias derivadas de un anticuerpo anti-CD16A no humano, tal como un anticuerpo anti-CD16A de ratón, o una o más regiones marco conservadas derivadas de secuencias marco conservadas de una o más inmunoglobulinas humanas. Se conoce una serie de anticuerpos monoclonales anti-CD16A no humanos, a partir de los que pueden obtenerse CDR y otras secuencias (véase, por ejemplo, Tamm *et al.* (1996) "The Binding Epitopes Of Human CD16 (Fc gamma RIII) Monoclonal Antibodies". Implications For Ligand Binding, *J. Imm.* 157:1576-81; Fleit *et al.* (1989) pág.159; "LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS", Reinherz *et al.*, ed. Nueva York: Springer-Verlag; (1986); "LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS" McMichael A. J., ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); "LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Kapp *et al.*, ed. Oxford Univ. Press, Oxford; "LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Schlossman *et al.*, ed. Oxford Univ. Press, Oxford; "LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS", Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, como se muestra en los ejemplos, se pueden obtener nuevas proteínas de unión a CD16A que reconozcan CD16A humana expresada en células usando métodos bien conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proteínas de unión relacionadas (por ejemplo, tecnología de hibridoma, presentación en fagos y similares). Véase, por ejemplo, O'Connell *et al.* (2002) "Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies", *J. Mol. Biol.* 321:49-56; Hoogenboom *et al.* (2000) "Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display

Technology”, *Imm. Today* 21:371078; Krebs *et al.* (2001) “High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies”, *J. Imm. Methods* 254:67-84; y otras referencias citadas en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden ser quimerizados o humanizados usando técnicas de humanización de anticuerpos conocidas en la técnica.

5 Como alternativa, es posible producir anticuerpos completamente humanos contra CD16A usando animales transgénicos que tengan elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.569.825 y 5.545.806), usando células de sangre periférica humana (Casali *et al.* (1986) “Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV”, *Science* 234:476-479), mediante el
10 rastreo de una biblioteca de ADN a partir de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general que se indica en Huse *et al.* (1989) “Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda”, *Science* 246:1275-1281, y mediante otros métodos.

15 En una realización preferida, el donante de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada del mismo, por ejemplo, tales como aquellos desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0010124. Se contempla que, para determinados fines, puede ser ventajoso usar proteínas de unión a CD16A que se unan al receptor de CD16A en el mismo epítipo al que se une 3G8, o al menos suficientemente cerca de este epítipo para bloquear la unión por 3G8. Los métodos para el cartografía de epítopos y los experimentos de unión competitiva para
20 identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas son bien conocidos por los expertos en la materia de la inmunología experimental. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citado anteriormente; Stähli *et al.* (1983) “Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies”, *Methods in Enzymology* 92:242-253; Kirkland *et al.* (1986) “Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies”, *J. Immunol.* 137:3614-3619; Morel *et al.* (1988) “Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations”, *Molec. Immunol.* 25:7-15; Cheung *et al.* (1990) “Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck
25 Hepatitis B Virus In Infected Ducks”, *Virology* 176:546-552; y Moldenhauer *et al.* (1990) “Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia”, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82. Por ejemplo, se puede determinar si dos anticuerpos se unen al mismo sitio usando uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa para ELISA, y luego midiendo la capacidad del segundo anticuerpo para unirse al antígeno capturado. También se puede obtener una comparación de epítopos marcando un primer anticuerpo, directa o
30 indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en las células, en solución o en una fase sólida.

También es posible medir la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor de CD16A a complejos inmunitarios formados en placas para ELISA. Dichos complejos inmunitarios se forman primero recubriendo la placa con un antígeno tal como fluoresceína, luego aplicando a la placa un anticuerpo anti-fluoresceína específico. Este complejo inmunitario sirve luego como ligando para los receptores de Fc solubles, tales como sFcR1IIa. Como
35 alternativa, es posible formar y marcar un complejo inmunitario soluble, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo. Luego se puede medir la capacidad de los anticuerpos para inhibir, en solución o en fase sólida, la unión de estos complejos inmunitarios marcados a los receptores de Fc en las células.

40 Las proteínas de unión a CD16A de la invención pueden contener o no una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en las proteínas de unión a scFv. Las regiones Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención, la proteína de unión a CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora modificada, por ejemplo, afinidad reducida por un ligando efector tal como un receptor de Fc o componente C1 del complemento en comparación con la región Fc no modificada (por ejemplo, el fragmento Fc de las proteínas IgG1 naturales). En una realización, la región Fc no está glicosilada en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Dichos anticuerpos carecen de la función efectora de Fc.

50 Por lo tanto, la proteína de unión a CD16A puede no presentar unión mediada por Fc a un ligando efector, tal como un receptor de Fc o el componente C1 del complemento debido a la ausencia del dominio Fc en la proteína de unión mientras, en otros casos, la falta de unión o la función efectora se debe a una alteración de la región constante del anticuerpo.

55 **5.1.2.1 Proteínas de unión a CD16A que comprenden secuencias CDR similares a las secuencias CDR de un Acm 3G8.**

Las proteínas de unión a CD16A que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen proteínas que comprenden una secuencia CDR derivada de (es decir, que tiene una secuencia igual o similar a) las CDR del anticuerpo
60 monoclonal de ratón 3G8. Los ADNc complementarios que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3G8 de ratón, incluyendo las secuencias que codifican CDR, se clonaron y secuenciaron como se describe. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de 3G8 se proporcionan más adelante. Usando la región variable y las secuencias CDR de ratón, se produjeron y analizaron las propiedades de un gran número de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados que comprendían regiones determinantes de la
65 complementariedad derivadas de las CDR de 3G8. Para identificar los anticuerpos humanizados que se unen a CD16A con alta afinidad y que tienen otras propiedades deseadas, se produjeron cadenas pesadas del anticuerpo que

comprendía una región VH con las CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (por coexpresión) con las cadenas ligeras del anticuerpo que comprendían una región VL con las CDR derivadas de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para el análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos resultantes se determinaron como se describe más adelante. Como se describe a continuación, las proteínas de unión a CD16A que comprenden CDR de 3G8, tales como las proteínas de anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento, pueden usarse de acuerdo con la invención.

5.1.2.1.1 Región VH

En un aspecto, la proteína de unión a CD16A de la invención puede comprender un dominio variable de cadena pesada en el que al menos una CDR (y normalmente tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión sean esencialmente humanas (derivadas de y esencialmente similares a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo 3G8 humanizado o fragmento del anticuerpo que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una región marco conservada esencialmente humana, pero en la que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena pesada difiere en la secuencia con respecto a la CDR de cadena pesada del anticuerpo de ratón 3G8 correspondiente. Por ejemplo, en una realización, la/s CDR difiere/n de la secuencia de las CDR de 3G8 al menos en que tienen una o más sustituciones de CDR que en la técnica se ha demostrado que afectan a la unión de 3G8 a CD16A, como se sabe en la técnica o como se describe en las Tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 adecuadas pueden contener 0, 1, 2, 3 o 4, o más de estas sustituciones (y suelen tener de 1 a 4 de estas sustituciones) y, opcionalmente, también pueden tener sustituciones adicionales.

Tabla 3. Sustituciones del dominio de V_H

N.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o Tyr o Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Tabla 4A. Secuencias de V_H derivadas de VH de 3G8

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	<u>A</u>						
Ch3G8VH	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
HxC	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
CxH	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-1	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-2	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-3	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-4	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-5	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-6	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-7	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-8	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-9	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-10	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>

ES 2 702 087 T3

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-11	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-12	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-13	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-14	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-15	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-16	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-17	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-18	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-19	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-20	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-21	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>B</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-22	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-23	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-24	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-25	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-26	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-27	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-28	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-29	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-30	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-31	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-32	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-33	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-34	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-35	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-36	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-7	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>H</u>	<u>E</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-38	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>F</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-39	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>I</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-40	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>G</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-41	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>J</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-42	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-43	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-44	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-45	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>J</u>	<u>D</u>	<u>B</u>

* Las letras de la Tabla 4A se refieren a las secuencias de las Tablas 4 B-H.

TABLA 4B
FR1

A	B	C	D	E		RESTO
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6
S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21

A	B	C	D	E		RESTO
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
30	31	32	33	34		SEQ ID NO

**TABLA 4C
CDR1**

A	B		RESTO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
35	36		SEQ ID NO

**TABLA 4D
FR2**

A	B		RESTO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
s	P		41
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
37	38		SEQ ID NO

**TABLA 4E
CDR2**

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		RESTO
H	H	H	H	H	L	H	F	H	F		50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W		52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N		54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S		60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S		62
L	L	L	L	L	L	F	F	F	F		63

ES 2 702 087 T3

K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		65
39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		SEQ ID NO

TABLA 4F
FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		RESTO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		66
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T		70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		74
S	K	K	K	K	K	K	K	K	K		75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V		79
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T		81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M		82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T		82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N		82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M		82C
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P		84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V		85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q		94
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		SEQ ID NO

TABLA 4G
CDR3

A	B	C	D		RESTO
I	I	I	I		95
N	N	N	N		96
P	P	P	P		97
A	A	A	A		98
W	W	Y	Y		99
F	F	F	F		100
A	D	A	D		101
Y	Y	Y	Y		102
59	60	61	62		SEQ ID NO

TABLA 4H
FR4

A	B		RESTO
W	W		103
G	G		104

A	B		RESTO
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
s	S		112
A	S		113
63	64		SEQ ID NO

En una realización, la proteína de unión a CD16A puede contener una secuencia del dominio variable de cadena pesada que es igual que el, o similar al, dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en **SEQ ID NO: 70**. Por ejemplo, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VH con una secuencia que: **(1)** difiere del dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1 (**SEQ ID NO: 70**) en cero, una o más de una de las sustituciones de CDR establecidas en la Tabla 1; **(2)** difiere del dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1 en cero, una o más de una de las sustituciones de región marco conservada como se establece en la **Tabla 1**; y **(3)** es idéntica en al menos aproximadamente el 80 %, a menudo idéntica en al menos aproximadamente el 90 %, y a veces idéntica en al menos aproximadamente el 95 %, o incluso idéntica en al menos aproximadamente el 98 % a la secuencia VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes.

Los dominios VH ilustrativos de las proteínas de unión a CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 (**SEQ ID NO: 81**, **SEQ ID NO: 71** y **SEQ ID NO: 72**, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 (**SEQ ID NO: 81** y **SEQ ID NO: 71**, respectivamente) se proporcionan mediante la **SEQ ID NO: 82** y la **SEQ ID NO: 83**, respectivamente.

El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de la construcción Hu3G8VH-1 (**SEQ ID NO: 70**) en al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis de las sustituciones que se muestran en la **Tabla 3**. Se cree que estas sustituciones dan lugar a una mayor afinidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de la secuencia con el dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes es de al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 98 %.

A modo ilustrativo y no como limitación, las secuencias de una serie de dominios VH de la proteína de unión a CD16A se muestran en la **Tabla 4**. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas a una región constante de C γ 1 humana se coexpresaron con la cadena ligera de la construcción hu3G8VL-1 (descrita más adelante) para formar los anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VH de hu3G8VH-1. Las construcciones en las que el dominio VH tiene una secuencia de hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 y 45 mostraron una alta afinidad de unión, mostrando unión intermedia los dominios VH hu3G8VH-6 y -40. Se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VH de las construcciones hu3G8VH-5 y hu3G8VH-22 (**SEQ ID NO: 71** y **SEQ ID NO: 72**, respectivamente).

5.1.2.2 Región VL

Se realizaron estudios similares para identificar las secuencias del dominio variable de cadena ligera con propiedades de unión favorables. En un aspecto, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que contiene un dominio variable de cadena ligera en el que al menos una CDR (y, normalmente, las tres CDR) tienen la secuencia de una CDR (y más comúnmente las tres CDR) de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el que las partes restantes de la proteína de unión son esencialmente humanas (derivadas de y esencialmente similares a, la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene las CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en una región marco conservada esencialmente humana, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena ligera difiere en secuencia con respecto a la CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. En una realización, la/s CDR difiere/n de la secuencia de 3G8 teniendo al menos una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, tal como, una o más sustituciones mostradas en la Tabla 2 (por ejemplo, arginina en la posición 24 de la CDR1; serina en la posición 25 de la CDR1; tirosina en la posición 32 de la CDR1; leucina en la posición 33 de la CDR1; ácido aspártico, triptófano o serina en la posición 50 de la CDR2; serina en la posición 53 de la CDR2; alanina o glutamina en la posición 55 de la CDR2; treonina en la posición 56 de la CDR2; serina en la posición 93 de la CDR3; y/o treonina en la posición 94 de la CDR3). En diversas realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas sustituciones (y a menudo tienen de 1 a 4 de estas sustituciones)

y, opcionalmente, pueden tener también otras sustituciones.

En una realización, la proteína de unión a CD16A adecuada puede contener una secuencia del dominio variable de cadena ligera que es igual que o similar al dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 73), cuya secuencia se proporciona en la **Tabla 6**. Por ejemplo, la invención proporciona una proteína de unión a CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que: (1) difiere del dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 73) en cero, una o más de las sustituciones de CDR que se establecen en la **Tabla 5: (2)** difiere del dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 en cero, una o más de las sustituciones de región marco conservada que se establecen en la **Tabla 5;** y (3) es idéntica en al menos aproximadamente el 80 %, a menudo, al menos idéntica en aproximadamente el 90 %, y, a veces, al menos idéntica en aproximadamente el 95 %, o incluso al menos idéntica en aproximadamente el 98 % a la secuencia VL de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 73) en las posiciones restantes.

Tabla 5. Sustituciones del dominio VL de 3G8

N.º	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp o Trp o Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala o Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

Tabla 6. Secuencias de VL derivadas de VL de 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B

ES 2 702 087 T3

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

* Las letras de la Tabla 6A se refieren a las secuencias de las Tablas 6B-H.

TABLA 6B FR1

A	B	RESTO
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
65	66	SEQ ID NO

TABLA 6C CDR1

A	B	C	D	E	F	G	RESTO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	F	M	F	33
N	N	N	N	N	A	A	34

ES 2 702 087 T3

A	B	C	D	E	F	G	RESTO
67	68	69	70	71	72	73	SEQ ID NO

TABLA 6D FR2

A	RESTO
W	35
Y	36
Q	37
Q	38
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
74	SEQ ID NO

TABLA 6E CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESTO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	SEQ ID NO

TABLA 6F FR3

A	B	RESTO
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78
E	Q	79
E	A	80

A	B		RESTO
E	E		81
D	D		82
T	V		83
A	A		84
T	V		85
Y	Y		86
Y	Y		87
C	C		88
86	87		SEQ ID NO

TABLA 6G CDR3

A	B	C	D	E		RESTO
Q	Q	Q	Q	Q		89
Q	Q	Q	Q	Q		90
S	S	S	S	S		91
N	Y	Y	N	N		92
E	S	E	S	E		93
D	T	D	D	T		94
P	P	P	P	P		95
Y	Y	Y	Y	Y		96
T	T	T	T	T		97
88	89	90	91	92		SEQ ID NO

TABLA 6H FR4

A	B		RESTO
F	F		98
G	G		99
G	Q		100
G	G		101
T	T		102
K	K		103
L	L		104
E	E		105
I	I		106
K	K		107
93	94		SEQ ID NO

5 Los dominios VL ilustrativos de las proteínas de unión a CD16 de la invención tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43, (**SEQ ID NO:84, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74, respectivamente**) como se muestra **Tablas 5 y 6**. Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican 3G8VL (**SEQ ID NO: 84**) y Hu3G8VL-1 (**SEQ ID NO: 73**) se proporcionan en **SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86**, respectivamente.

10 El dominio VL puede tener una secuencia que difiera de la construcción Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 73) en cero, uno, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8 o al menos 9 de las sustituciones que se muestran en la Tabla 2. Se cree que estas sustituciones dan lugar a una mayor afinidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administra a seres humanos. En determinadas realizaciones, el grado de identidad de las secuencias en las posiciones restantes es de al menos aproximadamente el 80 %, de al menos aproximadamente el 90 %, de al menos aproximadamente el 95 % o de al menos aproximadamente el 98 %.

20 A modo ilustrativo y no limitante, las secuencias de varios dominios VL de las proteínas de unión a CD16A se muestran en la **Tabla 6**. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio constante C_k humano se coexpresaron con una cadena pesada de Hu3G8VH (anteriormente descrita) para formar anticuerpos tetraméricos, y la unión de los anticuerpos a CD16A se midió para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (**SEQ ID NO: 73**). Las construcciones en las que el dominio VL tiene una secuencia de hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 42 mostraron una alta afinidad de unión y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron una unión intermedia. Las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VL de las construcciones hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 y hu3G8VL-43 se considera que tienen propiedades de unión particularmente favorables (**SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75 y SEQ ID NO:74, respectivamente**).

5.1.2.2.1 Combinaciones de los dominios VL y/o VH

Como se sabe en la técnica y se describe en otra parte del presente documento, las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina pueden expresarse mediante métodos recombinantes en condiciones en las que estas se asocian para producir un diacuerpo, o también pueden combinarse *in vitro*. De este modo, se apreciará que se puede combinar un dominio VL derivado de 3G8 descrito en el presente documento con un dominio VH derivado de 3G8 descrito en el presente documento para producir un diacuerpo de unión a CD16A, y se contemplan todas estas combinaciones.

A modo ilustrativo, y no como limitación, los ejemplos de los diacuerpos de CD16A útiles son aquellos que comprenden al menos un dominio VH y al menos un dominio VL, en los que el dominio VH es de hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 71, respectivamente) y el dominio VL es de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 43, respectivamente). En particular, los anticuerpos humanizados que comprenden hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 22) y, hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 o hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 74, respectivamente), o hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 71) y hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 73) tienen propiedades favorables.

Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de los dominios VL y VH descritos en el presente documento además pueden modificarse usando los métodos conocidos en la técnica, tales como maduración por afinidad (Véase Schier *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site", *J. Mol. Biol.* 263:551-567; Daugherty *et al.* (1998) "Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display", *Protein Eng.* 11:825-832; Boder *et al.* (1997) "Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries", *Nat. Biotechnol.* 15:553-557; Boder *et al.* (2000) "Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:10701-10705; Hudson *et al.* (2003) "Engineered Antibodies", *Nature Medicine* 9:129-39). Por ejemplo, las proteínas de unión a CD16A pueden modificarse usando técnicas de maduración por afinidad con el fin de identificar proteínas con mayor afinidad por CD16A y/o menor afinidad por CD16B.

Una proteína de unión a CD16 ilustrativa es el anticuerpo 3G8 de ratón. La secuencia de aminoácidos que comprende los dominios VH y VL del anticuerpo 3G8 humanizado se describe en las FIG. 2, 9, 14 y se establecen en las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 74.

5.2 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN REGIONES Fc O PARTES DE LAS MISMAS

La invención engloba las moléculas de diacuerpo que comprenden los dominios Fc o partes de los mismos (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En determinadas realizaciones, el dominio Fc, o la/s parte/s de los mismos, comprenden uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, CH2 o CH3). En otras realizaciones, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc, en las que el dominio Fc o parte del mismo comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución) con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre equivalente o parte del mismo. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la técnica y se usan principalmente para modificar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante evaluado mediante ensayos de la actividad de unión o la función efectora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de ELISA, SPR o ADCC. Dichos dominios Fc variantes, o partes de los mismos, tienen uso en la presente invención confiriendo o modificando la función efectora presentada por una molécula de diacuerpo de la invención que comprende un dominio Fc (o parte del mismo) como se ensaya funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de los linfocitos NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como modificadoras de la función efectora se desvelan en la solicitud internacional WO 04/063351, Publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0037000, 2005/0064514, 2006/0134709 y 2006/0177439.

En otras realizaciones, la divulgación engloba el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tales como las desveladas en Duncan *et al.* (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", *Nature* 332:563-564; Lund *et al.* (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", *J. Immunol.* 147:2657-2662; Lund *et al.* (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII", *Mol. Immunol.* 29:53-59; Alegre *et al.* (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo", *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins *et al.* (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92:11980-11984; Jefferis *et al.* (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation", *Immunol. Lett.* 44:111-117; Lund *et al.* (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors", *FASEB J.* 9:115-119; Jefferis *et al.* (1996) "Modulation Of Fc (Gamma) R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions", *Immunol. Lett.* 54:101-104; Lund *et al.* (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", *J. Immunol.* 157:4963-4969; Armour *et al.* (1999) "Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fc gamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities", *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624; Idusogie *et al.* (2000) "Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan", A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc",

5 *J. Immunol.* 164:4178-4184; Reddy *et al.* (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4", *J. Immunol.* 164:1925-1933; Xu *et al.* (2000) "In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", *Cell. Immunol.* 200:16-26; Idusogie *et al.* (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement", *J. Immunol.* 166:2571-2575; Shields *et al.* (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI", Fc gamma RII, Fc gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R", *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Jefferis *et al.* (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fc gamma R: Current Models", *Immunol. Lett.* 82:57-65; Presta *et al.* (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function", *Biochem. Soc. Trans.* 30:487-490; documento US 5.624.821; documento US 5.885.573; documento US 6.194.551; documento PCT WO 00/42072; documento PCT WO 99/58572.

15 En determinadas realizaciones, dichas una o más modificaciones a los aminoácidos de la región Fc disminuyen la afinidad y la avidéz de la región Fc y, por tanto, la molécula de diacuerpo de la invención, por uno o más receptores FcγR. En una realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIA. En otra realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIA. En otra
 20 realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o parte de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo silvestre, región Fc variante que solo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es FcγRIIB. En determinadas realizaciones, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc variante, en las que la variante confiere o media en la actividad aumentada de ADCC y/o una unión aumentada a FcγRIIA (CD32A), con respecto a una
 25 molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido usando los métodos conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento. En realizaciones alternativas, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc variante, en las que la variante confiere o media en la actividad disminuida de ADCC (u otra función efectora) y/o unión aumentada a FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, medido usando los métodos
 30 conocidos por los expertos en la materia y descritos en el presente documento.

La invención también engloba el uso de un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de IgG. Como se conoce en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora y/o a la actividad de unión mediada por el fragmento Fc. Sin embargo, estas modificaciones en las
 35 características funcionales además pueden perfeccionarse y/o manipularse por ingeniería cuando se ponen en práctica en el contexto de los isotipos IgG seleccionados. De manera similar, las características naturales del segmento Fc del isotipo pueden manipularse mediante una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentan diferentes propiedades físicas y funcionales incluyendo la semivida en suero, la fijación del complemento, afinidades de unión a FcγR y actividades de función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios bisagra y/o Fc. En determinadas realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan de manera independiente basándose en sus respectivas actividades de unión y/o función efectora diferentes con el fin de diseñar un diacuerpo con características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, dichas modificaciones de aminoácidos y las regiones bisagra/Fc de IgG se ensayado por separado para determinar su actividad de unión y/o función efectora como se describe en el presente documento o como se sabe en la técnica en el contexto de una IgG1. En determinadas
 45 realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y región bisagra/Fc de la IgG presentan funcionalidad similares, por ejemplo, mayor afinidad por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para determinar la unión a FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG seleccionada actúan entonces de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica para modificar dicha funcionalidad de la molécula de diacuerpo de la invención, con respecto a una molécula de diacuerpo de la invención que comprende una región Fc de tipo silvestre. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de la IgG presentan funcionalidades opuestas, por ejemplo, mayor o menor, respectivamente, afinidad por FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para determinar la actividad de unión a FcγR y/o la función efectora en el contexto de la molécula de
 50 diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprende una región Fc de tipo silvestre como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica; la combinación de dicha modificación de aminoácidos y región de la IgG seleccionadas "opuestas" actúan entonces para atemperar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en el diacuerpo de la invención con respecto a un diacuerpo de la invención que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo silvestre del mismo isotipo. Como alternativa, la invención engloba regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica y regiones IgG seleccionadas que presentan propiedades novedosas, propiedades que no fueron detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se ensayaron de manera independiente como se describe en el presente documento.

65 Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG, y los dominios de los mismos, son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 se presentan en las FIG. 1A-1B. La selección

y/o combinaciones de dos o más dominios de isotipos de IgG específicos para su uso en los métodos de la invención pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos precursores, incluyendo la afinidad por FcγR (Tabla 7; Flesch *et al.* (2000) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G", *J. Clin. Lab. Anal.* 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) "Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody", *J. Biol. Chem* 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies", *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 88:9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o dominios derivados de los isotipos de IgG que presentan unión limitada o no se unen a FcγRIIB, por ejemplo, IgG2 o IgG4, pueden encontrar un uso particular cuando se desea modificar por ingeniería un diacuerpo para aumentar al máximo la unión a un receptor activador y reducir al mínimo la unión a un receptor inhibidor. De manera similar, el uso de regiones o dominios Fc de isotipos de IgG conocidos por unirse preferentemente a C1q o FcγRIIIA, por ejemplo, IgG3 (Brüggemann *et al.* (1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies", *J. Exp. Med.* 166:1351-1361), pueden combinarse con las modificaciones de aminoácidos de Fc conocidas en la técnica para mejorar la ADCC, para modificar por ingeniería una molécula de diacuerpo de modo que se aumente al máximo la actividad de función efectora, por ejemplo, la activación del complemento o ADCC.

Tabla 7. Características generales de la unión de IgG a FcγR, adaptadas de Flesch y Neppert, 1999, *J. Clin. Lab. Anal.* 14:141-156

Receptor	Afinidad estimada para IgG (M ⁻¹)	Afinidad relativa
FcγRI	10 ⁸ -10 ⁹	IgG3>IgG1>>gG4 sin unión: IgG2
FcγRIIA R ^{131A}	<10 ⁷	IgG3>IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA H ^{131A}	<10 ⁷	IgG3>IgG1 >IgG2 sin unión: IgG4
FcγRIIB ^A	<10 ⁷	IgG3>IgG1 >IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIII	<10 ⁷	IgG3=IgG1 sin unión: IgG2,IgG4

^A solo se une a IgG complejada.

5.3 CONJUGADOS MOLECULARES

Las moléculas de diacuerpo de la invención se pueden fusionar de forma recombinante o conjugar químicamente (incluyendo las conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o parte del mismo, preferentemente de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, puede producirse mediante secuencias enlazadoras.

Además, las moléculas de diacuerpo de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden conjugarse a un agente terapéutico o a un resto de fármaco que modifique una respuesta biológica dada. Como alternativa a la conjugación directa, debido a los múltiples sitios de unión al epítipo en las moléculas de diacuerpo multivalentes, por ejemplo, tetravalentes, de la invención, se puede diseñar al menos una región de unión del diacuerpo para unirse al agente terapéutico o resto de fármaco deseado sin afectar a la unión al diacuerpo.

Los agentes terapéuticos o restos de fármacos no se consideran limitados a los agentes terapéuticos químicos convencionales. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, PE-40) o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antivírica de hierba carnín, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, pero sin limitación, interferón α (IFN-α), interferón β (IFN-β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF-α, TNF-β, AIM I según lo desvelado en la publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación PCT n.º WO 97/34911), ligando Fas y VEGF (publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una lincocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulador de colonias de macrófagos, ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, la hormona de crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas de diacuerpo de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden fusionarse a secuencias de marcadores, tales como un péptido para facilitar la purificación. En las realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Según lo descrito en Gentz *et al.* (1989) "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human

Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86: 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador de hemaglutinina “HA”, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson *et al.* (1984) “The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein”, *Cell*, 37:767-778) y el marcador “flag” (Knappik *et al.* (1994) “An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments”, *Biotechniques*, 17(4):754-761).

Otras proteínas de fusión adicionales se pueden generar mediante las técnicas de intercambio de genes, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio de codones (conocidos de manera colectiva como “intercambio de ADN”). El intercambio de ADN puede emplearse para modificar las actividades de las moléculas de la invención (por ejemplo, los sitios de unión al epítipo con mayores afinidades y menores constantes de disociación). Véanse, en general, las patentes de EE.UU. n.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten *et al.* (1997) “Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines”, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-733; Harayama (1998) “Artificial Evolution By DNA Shuffling”, *Trends Biotechnol.* 16:76-82; Hansson *et al.* (1999) “Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling”, *J. Mol. Biol.* 287:265-276; y Lorenzo *et al.* (1998) “PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus”, *BioTechniques* 24:308-313. Las moléculas de diacuerpo de la invención, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, además se pueden modificar para someterse a una mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos previos a la recombinación. Una o más partes de un polinucleótido que codifique una molécula de la invención, pueden ser recombinadas con una o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente divulgación también engloba moléculas de diacuerpo de la invención conjugadas a o que reconocen de manera inmuno-específica un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea una semivida en suero mayor/menor y/o dirigida a un determinado subconjunto de células. Las moléculas de la invención pueden usarse a efectos diagnósticos para, por ejemplo, controlar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. La detección se puede facilitar acoplando las moléculas de la invención a una sustancia detectable o mediante las moléculas que reconocen de manera inmuno-específica la sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente a las moléculas de la invención o indirectamente a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas, o la molécula puede reconocer de manera inmuno-específica la sustancia detectable: la unión inmuno-específica a dicha sustancia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.741.900 para información sobre los iones metálicos que pueden conjugarse a los anticuerpos para usarlos como agentes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Dichos diagnóstico y detección pueden realizarse diseñando las moléculas para que reconozcan de manera inmuno-específica la sustancia detectable o mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aecurina; material radiactivo tal como, pero sin limitación, bismuto (²¹³Bi), carbono (¹⁴C), cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), lantano (¹⁴⁰La), lutetio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Pr), prometio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rutemio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe), iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), itrio (⁹⁰Y), cinc (⁶⁵Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden reconocer de manera inmuno-específica o conjugarse a un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Los agentes citotóxicos o citotoxinas incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y *cis*-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula de diacuerpo de la invención puede conjugarse o puede diseñarse para reconocer de manera inmuno-específica restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase lo anterior para los ejemplos de los materiales radiactivos). En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético (DOTA) que puede unirse al polipéptido mediante una molécula enlazadora. Dichas moléculas enlazadoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.* (1998) "Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts, *Clin. Cancer Res.* 4:2483-2490; Peterson *et al.* (1999) "Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates, *Bioconjug. Chem.* 10:553-; y Zimmerman *et al.* (1999) "A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab)₂ Fragments., *Nucl. Med. Biol.* 26: 943-950.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a los polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, dominios Fc, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pág. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*. Robinson *et al.* (eds.), 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pág. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*. Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.* (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-158.

Las moléculas de diacuerpo de la invención pueden administrarse con o sin un resto terapéutico conjugado a las mismas, pueden administrarse solas o combinadas con factor/es citotóxico/s y/o citocina/s para su uso como tratamiento terapéutico. Cuando se administran solas, al menos un epítipo de una molécula de diacuerpo multivalente, por ejemplo, tetravalente, puede diseñarse para reconocer de manera inmuno-específica un agente terapéutico, por ejemplo, factor/es citotóxico/s y/o citocina/s, que puede administrarse de manera concurrente o posterior a la molécula de la invención. De esta manera, la molécula de diacuerpo puede escoger específicamente el agente terapéutico de manera similar a la conjugación directa. Como alternativa, una molécula de la invención puede conjugarse a un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos según lo descrito por Segal en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980. Las moléculas de diacuerpo de la invención también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o la purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden caracterizarse de una variedad de formas. En particular, las moléculas de la invención pueden ensayarse para determinar la capacidad para unirse de manera inmuno-específica a un antígeno, por ejemplo, FcRIIIA o FcRIIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o una parte del mismo) para determinar la capacidad para presentar interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de un dominio Fc (o parte del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo puede realizarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) "The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides", *BioTechniques*, 13:412-421), sobre perlas (Lam (1991) "A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity", *Nature*, 354: 82-84, sobre microplacas (Fodor (1993) "Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips", *Nature*, 364:555-556), sobre bacterias (patente de EE.UU. n.º 5.223.409), sobre esporas (patentes de EE.UU. n.º 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), sobre plásmidos (Cull *et al.* (1992) "Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:1865-1869) o sobre un fago (Scott *et al.* (1990) "Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library", *Science*, 249:386-390; Devlin (1990) "Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules", *Science*, 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) "Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:6378-6382; y Felici (1991) "Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector", *J. Mol. Biol.*, 222:301-310). Las moléculas que se hayan identificado para unirse de manera inmuno-específica a un antígeno, por ejemplo, FcγRIIIA, se pueden ensayar luego para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Las moléculas de la invención que se hayan modificado por ingeniería para que comprendan múltiples dominios de unión al epítipo pueden ensayarse para determinar la unión inmuno-específica a uno o más antígenos (por ejemplo, antígeno del cáncer y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) o, cuando las moléculas comprenden un dominio Fc (o una parte del mismo), para interacciones Fc-FcγR mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmuno-específica, reactividad cruzada e interacciones Fc-FcγR incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como el análisis de transferencia Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a una enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de precipitación inmunológica, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de radiometría inmunológica, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar solo algunos. Dichos ensayos son

habituales y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, **1994**, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

5 La afinidad de unión y la constante de desactivación de la interacción del dominio de unión al antígeno o la interacción
 Fc-FcγR pueden determinarse con ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es
 un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado, tal como FcγR tetramérico (por ejemplo,
³H o ¹²⁵I, véase el apartado 5.4.1) con una molécula de interés (por ejemplo, las moléculas de la presente invención
 que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo en presencia de cantidades crecientes del epítipo no
 10 marcado, tal como FcγR tetramérico (véase el apartado 5.4.1), y la detección de la molécula unida al antígeno
 marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención para un antígeno y las constantes de desactivación de
 la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación mediante el análisis de Scatchard.

15 Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la invención para un antígeno o FcγR pueden determinarse
 inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para
 interacciones antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR, incluyendo, pero sin limitación, ensayo de ELISA, ensayo de
 resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación. Preferentemente, las propiedades de unión de
 las moléculas de la invención también se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o
 más funciones de células efectoras mediadoras de FcγR, como se describe en el apartado 5.4.2. En las realizaciones
 20 más preferidas, las moléculas de la invención tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como
 los descritos y desvelados en el presente documento) como aquellos ensayos basados *in vitro*. Sin embargo, la
 presente invención no excluye moléculas de la invención que no presenten el fenotipo deseado en los ensayos *in vitro*,
 pero que presenten el fenotipo deseado *in vivo*.

25 En algunas realizaciones, el rastreo y la identificación de moléculas que comprenden múltiples dominios de unión al
 epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) se realizan ensayos de base funcional,
 preferentemente de alto rendimiento. Los ensayos de base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la
 técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediada por FcγR, tales como aquellas que se
 describen en el presente documento en los apartados 5.4.2 y 5.4.3. Los ejemplos no limitantes de las funciones de
 células efectoras que pueden usarse de acuerdo con los métodos de la invención, incluyen, pero sin limitación,
 30 citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos,
 fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a células, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad
 mediada por células dependientes del complemento.

35 En una realización preferida, se usa el análisis cinético BIAcore para determinar las constantes de activación o
 desactivación de la unión de las moléculas de la presente invención a un antígeno y/o a FcγR. El análisis cinético
 BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR de microplacas con moléculas inmovilizadas
 (por ejemplo, moléculas que comprenden dominios de unión al epítipo o dominios Fc (o partes de los mismos),
 respectivamente) en su superficie. El análisis BIAcore se describe en el apartado 5.4.3.

40 Preferentemente, el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las
 técnicas conocidas por los expertos en la materia, se usa para el ensayo inmunológico o funcional para caracterizar
 moléculas de la invención. Los citómetros de flujo son capaces de examinar rápidamente una gran cantidad de células
 individuales que se hayan unido, por ejemplo, opsonizadas, por las moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100
 millones de células por hora) (Shapiro *et al.* (1995) "Practical Flow Cytometry"). Además, los parámetros específicos
 45 que se usan para optimizar el comportamiento del diacuerpo incluyen, pero sin limitación, la concentración del antígeno
 (es decir, el complejo tetramérico FcγR, véase el apartado 5.4.1), el tiempo de la competencia cinética o condiciones
 rigurosas de FACS, pudiendo variarse todas ellas para seleccionar las moléculas de diacuerpo que comprendan las
 moléculas de la invención que presenten las propiedades de unión específicas, por ejemplo, unión concurrente a
 múltiples epítopos. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la
 50 técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 4.347.935;
 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.643.796; y 6.211.477. Otros citómetros de flujo conocidos son el sistema FACS
 Vantage™ fabricado por Becton Dickinson and Company, y el sistema COPAS™ fabricado por Union Biometrica.

55 La caracterización de la afinidad de unión al antígeno diana o la afinidad de unión a Fc-FcγR, y la valoración del
 antígeno diana o la densidad del FcγR en la superficie celular se pueden realizar mediante métodos bien conocidos
 en la técnica, tales como el análisis de Scatchard o mediante el uso de kits siguiendo las instrucciones del fabricante,
 tal como Quantum™ Simply Cellular® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El uno o más ensayos funcionales
 pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras
 60 mediada por FcγR conocido por el experto en la materia o descrito en el presente documento. En realizaciones
 específicas, las moléculas de la invención comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un
 dominio Fc (o parte del mismo) se ensaya en un análisis de ELISA para determinar la unión a uno o más antígenos
 diana o uno o más FcγR, por ejemplo, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA; seguido por uno o más ensayos de ADCC. En
 algunas realizaciones, las moléculas de la invención se ensayan además usando un ensayo basado en la resonancia
 de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en la resonancia de plasmón superficial son bien
 65 conocidos en la técnica y además se describen en el apartado 5.4.3, y se ilustran en el presente documento, por
 ejemplo, en el Ejemplo 6.1.

En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, un dominio Fc (o parte del mismo) se caracterizan además en un modelo animal para determinar la interacción con un antígeno diana (por ejemplo, un FcγR) o la interacción Fc-FcγR. Cuando se van a valorar interacciones de Fc-FcγR, los modelos animales preferidos que se usan en los métodos de la invención son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las patentes de EE.UU. n.º 5.877.397 y 6.676.927. Otros ratones transgénicos para su uso en dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ratones FcγRIIIa nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIIa humano; ratones FcγRIIIa nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIA humano; ratones FcγRIIIa nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIa humano; ratones FcγRIIIa nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones FcγRIIIa y FcγRIIA nuligénicos atímicos portadores de FcγRIIIa y FcγRIIA humano y FcγRIIIa nuligénicos atímicos, ratones FcγRIIA y FcγRIIB portadores de FcγRIIIa, FcγRIIA y FcγRIIB humanos.

5.4.1 ENSAYOS DE UNIÓN QUE COMPRENDEN FcγR

La caracterización de la unión al FcγR con moléculas que comprenden un dominio Fc y/o que comprenden el dominio de unión al epítipo específico de un FcγR se puede realizar usando cualquier FcγR, incluyendo, pero sin limitación, variantes polimórficas de FcγR. En algunas realizaciones, se usa una variante polimórfica de FcγRIIIa, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se realiza usando una variante polimórfica de FcγRIIIa que contenga una valina en la posición 158. La variante polimórfica 158V de FcγRIIIa presenta mayor afinidad por IgG1 que la variante 158F y una actividad ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Koene *et al.* (1997) "Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences The Binding Of IgG By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotype", *Blood*, 90:1109-14; Wu *et al.* (1997) "A Novel Polymorphism Of Fc gammaRIIIa (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease", *J. Clin. Invest.* 100: 1059-70); este resto, de hecho, interacciona directamente con la región bisagra inferior de IgG1 como se demostró recientemente por estudios de cocristalización de IgG1-FcγRIIIa, véase, por ejemplo, Sondermann *et al.* (2000) "The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex", *Nature*, 406(6793):267-273. Hay estudios que han demostrado que, en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos han mejorado la eficacia en pacientes homocigóticos para la variante 158V de FcγRIIIa. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigóticos con la variante 158V de FcγRIIIa en comparación con los pacientes homocigóticos para 158F de FcγRIIIa (véase, por ejemplo, Cartron *et al.* (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor Fc gammaRIIIa Gene", *Blood*, 99(3): 754-758). En otras realizaciones, las moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigóticos para la variante 158V de FcγRIIIa y 158F de FcγRIIIa, y en pacientes con la variante 131H de FcγRIIA. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, la selección de las moléculas de la invención con alotipos alternativos puede proporcionar variantes que, una vez modificadas por ingeniería para obtenerse diacuerpos terapéuticos, serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigóticos para dicho alotipo.

Se desarrolló un ensayo de unión a FcγR para determinar la unión de las moléculas de la invención a FcγR, y, en particular, para determinar la unión de los dominios Fc a FcγR. Los ensayos permitieron realizar la detección y cuantificación de las interacciones Fc-FcγR, a pesar de la débil afinidad inherente del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar por FcγRIIB y FcγRIIIa. El método se describe con detalle en la solicitud internacional WO 04/063351 y en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0037000 y 2005/0064514. En resumen, el método implica la formación de un complejo de FcγR que se puede preparar en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica, por ejemplo, FACS, ELISA, resonancia del plasmón superficial, etc. Además, el complejo de FcγR tiene una mayor avidéz por una región Fc, en comparación con un FcγR no complejo. De acuerdo con la invención, el complejo molecular preferido es un complejo tetramérico inmunitario, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIa, FcγRIIA o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida operativamente al extremo carboxi-terminal de la región soluble de FcγR (por ejemplo, la región soluble de FcγRIIIa, FcγRIIA o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una proporción molar para formar un complejo de FcγR tetramérico (preferentemente en una proporción molar de 5:1). La proteína de fusión se biotinila enzimáticamente, usando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un resto de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas se mezclan luego con SA-PE en una proporción molar de 1 x SA-PE:5X FcγR soluble biotinilado para formar un complejo tetramérico de FcγR.

Los polipéptidos que comprenden las regiones Fc han demostrado unirse a los complejos tetraméricos de FcγR con al menos una afinidad 8 veces superior a la de FcγR monomérico no complejo. La unión de los polipéptidos que comprenden las regiones Fc a los complejos tetraméricos FcγR se puede determinar usando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayos radioinmunológicos, ensayos ELISA, etc.

Los complejos inmunitarios que comprenden moléculas de la invención, y formados de acuerdo con los métodos anteriormente descritos, pueden usarse para determinar la funcionalidad de las moléculas que comprenden una región Fc en ensayos a base de células o libres de células.

Por cuestiones de conveniencia, los reactivos se pueden proporcionar en un kit para ensayo, es decir, una combinación envasada de reactivos para el ensayo de la capacidad de las moléculas que comprenden regiones Fc para unirse a los complejos tetraméricos de FcγR. Otras formas de complejos moleculares para su uso para determinar las interacciones de Fc-FcγR también se consideran útiles en los métodos de la divulgación.

5

5.4.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON CADENAS PESADAS VARIANTES

La caracterización de las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o partes de los mismos) usando ensayos conocidos por los expertos en la materia se pueden usar para identificar la función de células efectoras de las moléculas. En particular, la invención engloba la caracterización de moléculas de la invención para determinar la función de las células efectoras mediada por FcγR. Además, cuando al menos uno de los antígenos diana de la molécula de diacuerpo de la invención es un FcγR, la unión del FcγR por la molécula de diacuerpo puede servir para activar las vías mediada por FcγR similares a las activadas por la unión de FcγR-Fc. Por lo tanto, cuando al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede generar la función de célula efectora mediada por FcγR sin contener un dominio Fc (o parte del mismo), o sin la unión concomitante de Fc-FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden ensayarse de acuerdo con la invención, incluyen, pero sin limitación, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependientes del complemento. Se puede usar cualquier ensayo a base de células o libre de células conocido por los expertos en la materia para determinar la actividad de la función de células efectoras (para ver los ensayos de células efectoras, véase Perussia *et al.* (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells", *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini *et al.* (1988) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity", *Experientia*, 44(10): 841-848; Lehmann *et al.* (2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry", *J. Immunol. Methods*, 243(1-2): 229-42; Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction", *Methods Cell Biol.* 45: 147-64; Munn *et al.* (1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor", *J. Exp. Med.*, 172: 231-237; Abdul-Majid *et al.* (2002) "Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding *et al.* (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids", *Immunity* 8:403-411).

En una realización, las moléculas de la invención pueden ensayarse para determinar la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Como alternativa, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la invención puede ensayarse en otros fagocitos, por ejemplo, neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction", *Methods Cell Biol.*, 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la invención se caracteriza midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceinada mediante los métodos descritos previamente (Tridandapani *et al.* (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcγ Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells", *J. Biol. Chem.* 275: 20480-20487).

Otro ensayo ilustrativo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana, tal como FITC marcado con *Escherichia coli* (Molecular Probes) o FITC marcado con *Staphylococcus aureus* con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre, un anticuerpo anti-fluoresceína (véase Bedzyk *et al.* (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotypic Family", *J. Biol. Chem.* 264(3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para el ensayo ADCP dependiente de FcγR; o (ii) el anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que anula la unión a FcγRIII, como control de fondo para el ensayo ADCP dependiente de FcγR (iii) un diacuerpo que comprende el dominio de unión al epítipo del anticuerpo 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión al epítipo específico para FcγRIII; y la formación de la partícula opsonizada; la adición de cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a las células efectoras THP-1 (una estirpe celular monocítica disponible de ATCC) en una proporción de 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 o 100:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por FcγR; preferentemente incubando las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1,5 horas; la adición de azul de tripano tras la incubación (preferentemente a temperatura ambiente durante 2-3 min) a las células para inactivar la fluorescencia de las bacterias que se adhieren al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; la transferencia de células a un tampón para FACS (por ejemplo, 0,1 %, BSA en PBS, azida de sodio al 0,1%), analizando la fluorescencia de células THP1 usando FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferentemente, las células THP-1 que se usan en el ensayo se analizan por FACS para determinar la expresión de FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan CD32A y CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea para realizar el ensayo ADCP de acuerdo con los métodos de la invención. Las células THP-1 preferentemente se bloquean con IgG1 soluble a 100 µg/ml o suero humano al 10 %. Para analizar la magnitud de la ADCP, se establece preferentemente la ventana de análisis en las células THP-1 y se mide la mediana de la intensidad de la fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula y se presenta como el valor normalizado para el Acmq 4-4-20 de tipo silvestre obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a células THP-1 de manera que la proporción de las partículas

65

opsonizadas con respecto a las células THP-1 es de 30:1 o 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo ADCP se realiza con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que sirvan como actividad ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FYTC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo silvestre (para que sirva como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, D265A de 4-4-20 (para que sirva como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra realización, las moléculas de la invención pueden ensayarse para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Perussia *et al.* (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC(Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells", *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Weng *et al.* (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma", *J. Clin. Oncol.* 21:3940-3947; Ding *et al.* (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids", *Immunity* 8:403-411). Un ensayo ilustrativo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula permeable en la membrana celular se usa comúnmente para marcaje puesto que se une a las proteínas citoplasmáticas y, aunque es liberada espontáneamente de células con cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de células diana); opsonización de células diana con las moléculas de la invención que comprenden cadenas pesadas variantes; la combinación de células diana radiomarcadas, opsonizadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción apropiada de células diana con respecto a células efectoras; la incubación de la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; la recogida de los sobrenadantes; y el análisis de la radiactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención entonces se puede determinar, por ejemplo, usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental - cpm de fuga diana)/(cpm de lisis con detergente - cpm de fuga diana) x 100 %. Como alternativa, el % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima - liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la invención - % de lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Es posible generar una gráfica variando la proporción de células diana:efectoras o la concentración de anticuerpo.

Preferentemente, las células efectoras que se usan en los ensayos ADCC de la divulgación son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que preferentemente se purifican de sangre humana normal, usando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, usando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos de la invención expresan diferentes receptores activadores de FcγR. Las células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan FcγRIIIA y FcγRIIB, se pueden usar para determinar si los mutantes de cadena pesada de los anticuerpos muestran actividad ADCC aumentada y fagocitosis respecto a los anticuerpos IgG1 de tipo silvestre.

La estirpe celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y el receptor de baja afinidad FcγRIIA usando un método conocido por los expertos en la materia (Fleit *et al.* (1991) "The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII", *J. Leuk. Biol.* 49: 556-565). Las células THP-1 no expresan de manera constitutiva FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcR (Pricop *et al.* (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Th1 And Th2 Cytokines", *J. of Immunol.* 166: 531-537). El crecimiento de células THP-1 en presencia de citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y ocasiona una disminución en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede potenciarse aumentando la densidad celular (Tridandapani *et al.* (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of FcγRIIB In Human Monocytic Cells", *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082-5089). Por el contrario, se ha notificado que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIIA (Pearse *et al.* (1993) "Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fc Receptor For IgG Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-kDa Subunit Of Transcription Factor ISGF3", *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 4314-4318). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular se puede determinar usando FACS con los métodos comunes conocidos por los expertos en la materia. La expresión de FcγR inducida por citocinas en la superficie celular proporciona un sistema para ensayar la activación e inhibición en presencia de FcγRIIB. Si los linfocitos THP-1 son incapaces de expresar FcγRIIB, la invención también abarca otra estirpe celular de monocitos humanos, U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian de manera terminal en macrófagos en presencia de IFNγ y TNF (Koren *et al.* (1979) "In Vitro Activation Of A Human Macrophage-Like Cell Line", *Nature* 279: 328-331).

La destrucción de células tumorales dependiente de FcγR está mediada por linfocitos NK y macrófagos en modelos tumorales en ratones (Clynes *et al.* (1998) "Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma", *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 95: 652-656). La invención engloba el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficacia de los mutantes de Fc para generar la citotoxicidad celular de células diana en ensayos de fagocitosis y ADCC. Los patrones de expresión de FcγRI, FcγRIIIA y FcγRIIB se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de FcγR a partir de monocitos elutriados, congelados, monocitos elutriados, frescos, monocitos mantenidos en FBS al 10 %, y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano se pueden determinar usando los métodos comunes para los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden teñir las células con anticuerpos específicos de FcγR y analizarlas por FACS para determinar los perfiles de FcR. Las

condiciones que mejor imitan la expresión de FcγR *in vivo* de los macrófagos se usan después para los métodos de la invención.

5 En algunas realizaciones, pueden usarse células de ratón, en especial, cuando no se pueden obtener células humanas con los perfiles de FcγR correctos. En algunas realizaciones, puede usarse la estirpe de células de macrófagos de ratón RAW264.7(ATCC) que puede transfectarse con FcγRIIIA humano y los transfectantes estables se aíslan usando los métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ralph *et al.* (1977) "Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS", *J. Immunol.* 119: 950-4). Los transfectantes pueden cuantificarse para determinar la expresión de FcγRIIIA mediante análisis de FACS
10 usando la experimentación rutinaria, y los de alta expresión pueden usarse en ensayos ADCC de la invención. Se pueden aislar los macrófagos peritoneales esplénicos que expresen FcγR humano de ratones transgénicos nuligénicos tales como los desvelados en el presente documento.

15 Pueden recogerse linfocitos de sangre periférica de donantes (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población de células mononucleares aisladas, la mayor parte de la actividad ADCC se encuentra a través de los linfocitos citolíticos naturales (NK) que contengan FcγRIIIA, pero no FcγRIIB en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes en la activación de ADCC de los linfocitos NK y establecen los reactivos para realizar ensayos con monocitos elutriados.

20 Las células diana que se usan en los ensayos ADCC de la invención incluyen, pero sin limitación, estirpes celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con número de registro ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp *et al.* (1976) "Human Breast Cancer In Culture", *Recent Results Cancer Res.* 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, por ejemplo, células Raji con número de registro ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein *et al.* (1965) "Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma", *J. Natl. Cancer Inst.* 34: 231-240), y células de Daudi con número de registro ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein *et al.* (1968) "Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In Vivo And In Derived Culture Lines", *Cancer Res.* 28: 1300-1310). Las células diana pueden ser reconocidas por el sitio de unión al antígeno de la molécula de diacuerpo que se va a ensayar.

30 El ensayo ADCC se basa en la capacidad de los linfocitos NK para mediar en la muerte celular a través de una vía apoptótica. Los linfocitos NK median en la muerte celular en parte por el reconocimiento de FcγRIIIA de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno en una superficie celular. Los ensayos ADCC que se usan de acuerdo con los métodos de la divulgación pueden ser ensayos basados en la radiactividad o ensayos basados en la fluorescencia. El ensayo ADCC usado para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende
35 marcar las células diana, por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, la opsonización de células diana con un anticuerpo que reconozca un receptor de superficie celular en la célula diana a través de su sitio de unión al antígeno; la combinación de células diana opsonizadas, marcadas y las células efectoras en una proporción apropiada, que puede determinarse mediante experimentación rutinaria; cosechar las células; detectar el marcador en el sobrenadante de células diana lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en el marcador usado.
40 Las células diana se pueden marcar con un marcador radiactivo o un marcador fluorescente, usando los métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los marcadores incluyen, pero sin limitación, [⁵¹Cr]Na₂CrO₄; y el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA).

45 En un método preferido, específico, se usa un ensayo fluorimétrico con resolución temporal para medir la actividad ADCC contra células diana que se han marcado con el éster acetoximetílico del ligando de potenciación de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA). Dichos ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, por ejemplo, véase, Blomberg *et al.* (1996) "Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand", *Journal of Immunological Methods*, 193: 199-206. En resumen, se marcan las células diana con el diéster acetoximetílico de TDA (2,2':6',2"-terpiridin-6,6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo)), (BATDA), que rápidamente se difunde a través de la membrana celular de células viables. Las esterazas intracelulares escinden los grupos éster, y la molécula TDA impermeable en la membrana regenerada se queda atrapada dentro de la célula. Tras la incubación de células efectoras y diana, por ejemplo, durante al menos
50 dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, bajo CO₂ al 5 %, la molécula de TDA liberada de células diana lisadas se quela con Eu³⁺ y se cuantifica la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

55 En otra realización específica, el ensayo ADCC que se usa para caracterizar las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión al epitopo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) comprende las siguientes etapas: preferentemente 4-5 x 10⁶ células diana (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) se marcan con bis(acetoximetil)2,2':6',2"-terpiridin-6,6"-dicarboxilato (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficacia óptima del marcaje, el número de células diana que se usa en el ensayo ADCC preferentemente no debe ser superior a 5 x 10⁶. Se añade el reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37 °C, preferentemente con el CO₂ al 5 %, durante al menos 30 minutos. Después, se lavan las células con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfipirazol 0,125 mM, y medios que contienen sulfipirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas luego se opsonizan (se recubren) con una molécula de la invención que contenga un dominio de unión al epitopo específico para FcγRIIA y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo). En las realizaciones preferidas, la molécula usada

en el ensayo ADCC también es específica de un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno del cáncer. La molécula de diacuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno del cáncer o tumoral, tal como los que se enumeran en el apartado 5.6.1. Las células diana del ensayo ADCC se seleccionan de acuerdo con los sitios de unión al epítipo modificados por ingeniería en el diacuerpo de la invención, de modo que el diacuerpo se una específicamente a un receptor de superficie celular de la célula diana.

Las células diana se añaden a las células efectoras, por ejemplo, PBMC, para obtener proporciones de células efectoras: células diana de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, bajo CO₂ al 5 %. Se recogen los sobrenadantes celulares y se añaden a una solución ácida de europio (por ejemplo, solución DELFIA Europium, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (por ejemplo, Víctor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (LM) y la liberación espontánea (LE) se determinan mediante la incubación de células diana con TX-100 al 1 % y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de los anticuerpos (AICC) se mide mediante la incubación de células diana y efectoras en ausencia de una molécula de ensayo, por ejemplo, el diacuerpo de la invención. Cada ensayo se realiza preferentemente por triplicado. La media del porcentaje de la lisis específica se calcula como: liberación experimental (ADCC) - AICC/(LM-LE) x 100.

Se pueden usar ensayos conocidos en la técnica e ilustrados en el presente documento para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (o partes de los mismos). Para determinar la unión a C1q, puede realizarse un ensayo ELISA de unión a C1q. Un ensayo ilustrativo puede comprender lo siguiente: se pueden recubrir placas de ensayo durante la noche a 4 °C con polipéptido que comprenda una molécula de la invención o polipéptido de partida (control) en un tampón de recubrimiento. Después, las placas se lavan y se bloquean. Tras lavar, se puede añadir a cada pocillo una alícuota de C1q humano e incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, se pueden añadir a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo de oveja anti-C1q de complemento conjugado a peroxidasa e incubarse durante una hora a temperatura ambiente. La placa se puede lavar otra vez con tampón de lavado y se pueden añadir a cada pocillo 100 µl de tampón de sustrato que contenga OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina (Sigma)). Se puede dejar que la reacción de oxidación, observada por la presencia de un color amarillo, avance durante 30 minutos y detenerla mediante la adición de 100 µl de 4,5 NH₂SO₄. Luego se lee la absorbancia a (492-405) nm.

Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, según lo descrito en Gazzano-Santoro *et al.* (1997) "A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody", *J. Immunol. Methods* 202:163-171. En resumen, se pueden diluir con tampón diversas concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o parte del mismo) y complemento humano. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente 1 x 10⁶ células/ml. Se pueden añadir mezclas de las moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc (variante) (o parte del mismo), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos para cultivo tisular, de fondo plano y dejarse incuban durante 2 horas a 37°C y CO₂ al 5 % para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Se pueden añadir entonces 50 µl de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubarse durante la noche a 37 °C. Se mide la absorbancia usando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Las concentraciones de las muestras se pueden calcular a partir de una curva patrón y se presenta el porcentaje de actividad en comparación con una molécula sin variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc sin variante, para la variante de interés.

5.4.3 OTROS ENSAYOS

Las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, un dominio Fc se pueden ensayar usando cualquiera de los ensayos basados en la resonancia de plasmón superficial conocidos en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión al antígeno o unión Fc-FcγR. Cualquier instrumento de SPR disponible en el comercio incluyendo, pero sin limitación, los instrumentos BIAcore, disponibles de Biacore AB (Uppsala, Suecia); los instrumentos IAsys disponibles de Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible de Windsor Scientific Limited (Berks, RU), los sistemas SPR-CELLIA disponibles de Nippon Laser y Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y SPR Detector Spreeta disponible de Texas Instruments (Dallas, TX) se pueden usar en la presente invención. Para más información sobre la tecnología basada en SPR, véase Mullet *et al.* (2000) "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays", *Methods* 22: 77-91; Dong *et al.* (2002) "Some new aspects in biosensors, *Reviews in Mol. Biotech.* 82: 303-23; Fivash *et al.* (1998) "BIAcore For Macromolecular Interaction", *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101; Rich *et al.* (2000) "Advances In Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61. Además, se puede usar cualquiera de los instrumentos de SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones de proteína-proteína descritos en las patentes de EE.UU. n.º 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125.

En resumen, los ensayos basados en SPR implican la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y el control de su interacción con el otro miembro del par de unión en solución y en tiempo real. El análisis

de SPR se basa en la medición del cambio del índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que sucede tras la formación o disociación del complejo. La superficie en la que ocurre la inmovilización es la microplaca de sensor, que está en el núcleo de la tecnología SPR; que consiste en una superficie de vidrio recubierta con una capa delgada de oro y que forma la base para una selección de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. En el mercado, se dispone de una variedad de microplacas, en especial, de las empresas que se han enumerado anteriormente, pudiéndose usar todas ellas en los métodos de la invención. Los ejemplos de microplacas de sensor incluyen las disponibles en BIAcore AB, Inc., por ejemplo, microplaca de sensor CM5, SA, NTA y HPA. Se puede inmovilizar una molécula de la invención sobre la superficie de una microplaca de sensor usando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización que se conocen en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, el acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, el acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfhidrilo, la unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, el acoplamiento de aldehído a grupos hidrato de carbono y la unión mediante el marcador de histidina con microplacas de NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc, a un antígeno o un FcγR se pueden determinar usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se ha tratado anteriormente, véase el apartado 5.4.1, se puede usar cualquier FcγR para evaluar la unión de las moléculas de la invención cuando al menos un sitio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce de manera inmuno-específica un FcγR, y/o cuando la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o parte del mismo). En una realización específica, el FcγR es FcγRIIIA, preferentemente, un FcγRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcγRIIIA unida a la secuencia de enlazador-AVITAG. En otra realización específica, el FcγR es FcγRIIB, preferentemente, un FcγRIIB monomérico soluble.

En todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento/la unión de FcγR con una molécula de la invención se puede efectuar mediante múltiples dominios: en determinadas realizaciones, las moléculas de la invención reconocen de manera inmuno-específica un FcγR a través de uno de los múltiples dominios de unión al epítipo; en otras realizaciones más, cuando la molécula de la invención contiene un dominio Fc (o parte del mismo), la molécula de diacuerpo puede reconocer de manera inmuno-específica un FcγR por las interacciones de Fc-FcγR; en más realizaciones adicionales, cuando una molécula de la invención comprende un dominio Fc (o parte del mismo) y un sitio de unión al epítipo que reconoce de manera inmuno-específica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR a través de un dominio de unión al epítipo o el dominio Fc (o parte del mismo). Un ensayo ilustrativo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) a un antígeno y/o un FcγR usando un instrumento BIAcore, comprende lo siguiente: se inmoviliza un primer antígeno en una de las cuatro celdas de flujo de una superficie de microplaca de sensor, preferentemente mediante química de acoplamiento con amina de modo que aproximadamente 5.000 unidades de respuesta (UR) de dicho primer antígeno se inmovilicen en la superficie. Una vez que se prepara una superficie apropiada, las moléculas de la invención que reconocen de manera inmuno-específica el primer antígeno se pasan por la superficie, preferentemente, mediante inyecciones de un minuto de una solución 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. Los niveles de moléculas de la invención unidas a la superficie en esta etapa normalmente varían entre 400 y 700 UR. A continuación, se inyectan series de diluciones de un segundo antígeno (por ejemplo, FcγR) o el receptor FcγR en el tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5) sobre la superficie a 100 µl/min. La regeneración de las moléculas entre diferentes diluciones del segundo antígeno o el receptor se lleva a cabo preferentemente mediante inyecciones individuales de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM, pH 9,4; NaCl 3 M. Se contempla cualquier técnica de regeneración conocida en la técnica.

Una vez que se recopila todo el conjunto de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan de manera global usando algoritmos de cálculo suministrados por el fabricante del instrumento de SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} and K_{off} , a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_d se deduce como el cociente de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos derivados se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Para más información sobre diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszka (1997) "Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors", *Current Opinion in Biotechnology* 8: 50-7; Fisher *et al.* (1994) "Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions", *Current Opinion in Biotechnology* 5: 389-95; O'Shannessy (1994) "Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature", *Current Opinion in Biotechnology*, 5:65-71; Chaiken *et al.* (1992) "Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands", *Analytical Biochemistry*, 201: 197-210; Morton *et al.* (1995) "Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equation, And Numerical Integration", *Analytical Biochemistry* 227: 176-85; O'Shannessy *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83.

En las realizaciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados usando un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, pueden usarse como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula de la invención en un ensayo funcional, por ejemplo, ADCC. Un método ilustrativo para predecir la eficacia de una molécula de la invención

basándose en los parámetros cinéticos obtenidos de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{off} para la unión de una molécula de la invención a Fc γ R111A y Fc γ R11B (mediante un dominio de unión al epítipo y/o un dominio Fc (o parte del mismo)); representar gráficamente (1) K_{off} (de tipo silvestre)/ K_{off} (mutante) para Fc γ R111A; (2) K_{off} (mutante)/ K_{off} (de tipo silvestre) para Fc γ R11B frente a los datos de ADCC. Los números superiores a uno muestran una menor velocidad de disociación para Fc γ R111A y una mayor velocidad de disociación para Fc γ R11B respecto al de tipo silvestre; y presenta una función ADCC mejorada.

5.5 MÉTODOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE DIACUERPO DE LA INVENCION

Las moléculas de diacuerpo de la presente invención pueden producirse usando diversos métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis de proteína de novo y la expresión recombinante de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencia de ácidos nucleicos deseadas se pueden producir mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis por PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado) o mediante síntesis del ADN en fase sólida. Normalmente, se usan métodos de expresión recombinante. En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica los dominios VH y/o VL de CD16A; en otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o VL de CD32B. A causa de la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

5.5.1 POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCION

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, incluyendo los polipéptidos y anticuerpos. Se pueden obtener los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos se puede determinar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos de las moléculas que son identificadas mediante los métodos de la invención, la secuencia de nucleótidos se puede modificar por ingeniería usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning. A Laboratory Manual 3^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), generando, por ejemplo, Anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, generando sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de los aminoácidos.

En una realización, se pueden explorar bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica mediante técnicas convencionales conocidas para clonar los ácidos nucleicos que codifiquen las moléculas de la invención.

5.5.2 EXPRESION RECOMBINANTE DE LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCION

Una vez obtenida una secuencia de ácido nucleico que codifique las moléculas de la invención (es decir, los anticuerpos), el vector para la producción de las moléculas se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas. Los métodos bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contengan las secuencias codificantes para las moléculas de la invención y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel *et al.* eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada mediante los métodos del presente documento se puede transferir a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y cultivarse después las células transfectadas mediante las técnicas convencionales para producir las moléculas de la invención. En realizaciones específicas, la expresión de las moléculas de la invención está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

Las células hospedadoras que se usan para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli* o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como un elemento promotor mayor del gen temprano intermedio procedente del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foecking *et al.* (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors", *Gene* 45:101-106; Cockett *et al.* (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification", *Biotechnology*

8:662-667).

Se puede utilizar una variedad de sistemas vectoriales de expresión en el hospedador para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento. Dichos sistemas de expresión en el hospedador representan vehículos mediante los que se pueden producir las secuencias de codificación de las moléculas de la invención y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias que codifican los nucleótidos adecuados, expresan las moléculas de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contengan secuencias codificantes para las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces pichia*) transformada con vectores de expresión recombinante de levadura que contengan secuencias que codifiquen las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, baculovirus) que contengan las secuencias codificantes de las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión recombinante de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (MVCo) y virus del mosaico de tabaco (VMT) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contengan las secuencias que codifiquen las moléculas identificadas mediante los métodos de la invención; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase el documento US 5.807.715), células Per C.6 (células retinianas humanas desarrolladas por Crucell) que alberguen construcciones de expresión recombinante que contengan promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar de forma ventajosa una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto de la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, se pueden deseñar vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Rüther *et al.* (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones", *EMBO J.* 2:1791-1794), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región que codifica *lac Z* de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye *et al.* (1985) "Up-Promoter Mutations In The Ipp Gene Of Escherichia Coli", *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3110; Van Heeke *et al.* (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli", *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); y similares. Se pueden usar también vectores pGEX para expresar los polipéptido foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa de la trombina o de la proteasa del factor Xa de tal manera que el producto del gen diana clonado puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede ser clonada de manera individual en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y se puede colocar bajo el control de un promotor de VPNAc (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células hospedadoras de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traducción adenovírico, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, se puede insertar este gen quimérico en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) producirá un virus recombinante viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en hospedadores infectados (por ejemplo, Véase Logan *et al.* (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:3655-3659). Para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpos insertadas también pueden ser necesarias señales de inicio específicas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, naturales y sintéticos. La eficacia de expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (Véase Bitter *et al.* (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast", *Methods in Enzymol.* 153:516-544).

Además, se puede seleccionar una cepa de célula hospedadora que module o modifique la expresión de las secuencias insertadas y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de anticuerpo de la invención se pueden expresar como un solo producto génico (por ejemplo, como una sola cadena

polipeptídica, es decir, como precursor de poliproteína), que requiere la escisión proteolítica mediante mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar polipéptidos separados de las moléculas de diacuerpo de la invención. También se describe la modificación por ingeniería de una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteína que contenga los polipéptidos de la invención, que incluye secuencias codificantes capaces de dirigir la escisión posterior a la traducción del precursor de poliproteína. La escisión posterior a la traducción del precursor de poliproteína produce los polipéptidos de la invención. La escisión posterior a la traducción de la molécula precursora que comprende los polipéptidos de la invención se puede producir *in vivo* (es decir, dentro de la célula hospedadora mediante sistemas celulares/mecanismos recombinantes o nativos, por ejemplo, la escisión de furina en un sitio apropiado) o puede producirse *in vitro* (por ejemplo, la incubación de dicha cadena polipeptídica en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende las condiciones o los reactivos conocidos por fomentar la acción proteolítica deseada). La purificación y modificación de las proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica, de modo que el diseño del precursor de poliproteína podría incluir una serie de realizaciones fáciles de apreciar por el trabajador experto. Cualquiera de las proteasas o peptidasas conocidas en la técnica se puede usar para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR[^]GS (**SEQ ID NO: 91**)), o el factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR[^] (**SEQ ID NO:92**) (Nagai *et al.* (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli", *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 82:7252-7255, y revisado en Jenny *et al.* (2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa", *Protein Expr. Purif.* 31:1-11), enteroquinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK[^] (**SEQ ID NO:93**) (Collins-Racie *et al.* (1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA", *Biotechnology* 13:982-987)), furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR[^], con preferencia por RX(K/R)R[^] (**SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente**) (R adicional en la posición P6 parece potenciar la escisión)), y AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ[^]G (**SEQ ID NO:96**) (Parks *et al.* (1994) "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase", *Anal. Biochem.* 216:413-417)) y la proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa. Véase, por ejemplo, apartado 6.4, anteriormente citado.

Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posterior a la traducción de las proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar estirpes de células adecuadas o sistemas hospedadores para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

A largo plazo, se prefiere la producción de alto rendimiento de proteínas recombinantes de expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar por ingeniería las estirpes celulares que expresan de manera estable un anticuerpo de la invención. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, pueden dejarse crecer las células modificadas mediante ingeniería durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación, cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a la vez, puedan clonarse y expandirse en estirpes de células. Este método se puede usar de forma ventajosa para modificar mediante ingeniería estirpes de células que expresen los anticuerpo de la invención. Dichas estirpes de células modificadas mediante ingeniería pueden ser particularmente útiles en la exploración y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la invención.

Se puede usar una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de timidina quinasa del virus de herpes simple (Wigler *et al.* (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells", *Cell* 11: 223-232), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska *et al.* (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy", *Bioessays* 14: 495-500) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.* (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene", *Cell* 22: 817-823) que se pueden emplear genes en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia antimetabolitos como la base de selección de los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.* (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:3567-3570; O'Hare *et al.* (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 1527-1531); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan *et al.* (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 2072-2076); *neo*, confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", *Anri. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science* 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) "Human Gene Therapy", *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217) y *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.* (1984) "Expression

Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells”, *Gene* 30:147-156). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel *et al.* (eds.), **1993**, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), **1994**, Current Protocols in Human Genetics. John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.* (1981) “A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells”, *J. Mol. Biol.* 150: 1-14.

Se pueden aumentar los niveles de expresión de una molécula de la invención mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning. Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia de nucleótidos de un polipéptido de la molécula de diacuerpo, también aumentará la producción del polipéptido (Crouse *et al.* (1983) “Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes”, *Mol. Cell. Biol.* 3:257-266).

La célula hospedadora puede transfectarse junto con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo, y codificando el segundo vector el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la expresión de ambos polipéptidos. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes para los polipéptidos de las moléculas de la invención pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de la invención (es decir, diacuerpos) haya sido expresada de forma recombinante, se puede purificar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos (por ejemplo, análogos a los esquemas de purificación de anticuerpos basados en la selectividad de los antígenos) por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio de iones, de afinidad, en particular, por afinidad por el antígeno específico (opcionalmente, tras la selección de la Proteína A cuando la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o parte del mismo)), y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos.

5.6 MÉTODOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, un trastorno o una infección cuando se desea la función de células efectoras (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa). Como se ha tratado anteriormente, los diacuerpos de la invención pueden presentar funcionalidad de tipo anticuerpo para generar una función efectora, aunque la molécula de diacuerpo no comprenda un dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión al epítipo que reconozca de manera inmuno-específica un FcγR, la molécula de diacuerpo puede presentar unión a FcγR y actividad análogas a las interacciones de Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la invención pueden unirse a un antígeno de superficie celular y un FcγR (por ejemplo, FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, linfocito NK), estimulando una función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula.

En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo de la invención comprende un dominio Fc (o parte del mismo). En dichas realizaciones, el dominio Fc puede comprender además al menos una modificación de aminoácido en relación con el dominio Fc de tipo silvestre (o parte del mismo) y/o puede contener dominios de uno o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden presentar fenotipos conferidos o modificados con respecto a las moléculas que comprenden el dominio Fc de tipo silvestre, tal como una actividad de función efectora modificada o conferida (por ejemplo, ensayada en un ensayo dependiente de linfocitos NK o dependiente de macrófagos). En dichas realizaciones, las moléculas de la invención con actividad de función efectora conferida o modificada son útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, un trastorno o una infección cuando se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora. En determinadas realizaciones, las moléculas de diacuerpo de la invención que comprenden un dominio Fc (o parte del mismo) median en la cascada dependiente del complemento. Las variantes del dominio Fc identificadas como modificadoras de la función efectora se desvelan en la solicitud internacional WO 04/063351, Publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0037000, 2005/0064514, 2006/0134709 y 2006/0177439.

La invención engloba la molécula de diacuerpo de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo) modificado por ingeniería de acuerdo con la invención, molécula que se una a un antígeno del cáncer. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, la inhibición, la reducción del crecimiento o la regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de la invención median en la función efectora produciendo el aclaramiento del tumor, la disminución del tumor o una combinación de los mismos. En realizaciones

alternativas, los diacuerpos de la invención median en la actividad terapéutica mediante reticulación de antígenos y/o receptores de superficie celular y potencian la apoptosis o la señalización de los reguladores negativos del crecimiento.

Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de diacuerpo de la invención presentan una mejor eficacia terapéutica con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo de unirse de manera inmuno-específica a una célula diana que exprese un antígeno específico (por ejemplo, FcγR) a niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer en la célula diana más tiempo debido a una mejor avidéz de la interacción de diacuerpo-epítipo.

Los diacuerpos de la invención con mejores afinidad y avidéz por los antígenos (por ejemplo, FcγR) son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención o el control de un cáncer, u otras enfermedades o trastornos, en un sujeto, en el que los FcγR se expresan a niveles bajos en las poblaciones de células diana. Como se usa en el presente documento, la expresión de FcγR en células se define en términos de la densidad de dichas moléculas por célula, medida usando los métodos comunes conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión al epítipo y, opcionalmente, un FcγR (o parte del mismo) preferentemente también tienen una avidéz y afinidad y/o función efectora conferida o potenciada en células que expresan un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del cáncer, a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o inferior, a una densidad de 5.000 moléculas/célula o inferior o a una densidad de 1.000 moléculas/célula o inferior. Las moléculas de la invención tienen utilidad particular para el tratamiento, la prevención o el control de una enfermedad o de un trastorno, tal como el cáncer, en una subpoblación, en las que el antígeno diana se expresa a niveles bajos en la población de células diana.

Las moléculas de la invención también se pueden utilizar ventajosamente en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por el tratamiento o la prevención de enfermedades, tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. En una realización específica, las moléculas de la invención pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyético (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 y IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con las moléculas y aumentan la respuesta inmunitaria. Las moléculas de la invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar una enfermedad, un trastorno o una infección tal como, por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios o agentes antivíricos, por ejemplo, como se detalla en el apartado 5.7.

5.6.1 CÁNCERES

La invención engloba el diacuerpo de la invención para su uso en el tratamiento o en la prevención del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden los dominios de unión al epítipo de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el tratamiento o la prevención de cáncer en un sujeto con polimorfismos de FcγR, tales como los que son homocigotos para los alelos 158V de FcγRIIIA o 158F de FcγRIIIA. Se puede modificar por ingeniería al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para unirse de manera inmuno-específica a FcγRIIIA (158F). Puede modificarse por ingeniería al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para unirse de manera inmuno-específica a FcγRIIIA (158V).

La eficacia de la terapia convencional con anticuerpos monoclonales depende del polimorfismo del FcγR del sujeto (Cartron *et al.* (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcRIIIa Gene", *Blood* 99: 754-758; Weng *et al.* (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma", *J Clin Oncol.* 21(21):3940-3947). Estos receptores son expresados en la superficie de células efectoras y median en la ADCC. Los alelos de alta afinidad de los receptores activadores de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para intervenir en la ADCC. Al contrario que la dependencia de las interacciones de Fc-FcγR para efectuar la función efectora, los métodos de la invención engloban la modificación por ingeniería de moléculas para que reconozcan de manera inmuno-específica los receptores activadores de baja afinidad, permitiendo que las moléculas sean diseñadas para un polimorfismo específico. Como alternativa o además, la molécula de la invención puede modificarse por ingeniería para que comprenda un dominio Fc variante que presente afinidad potenciada para FcγR (con respecto a un dominio Fc de tipo silvestre) en las células efectoras. Las moléculas modificadas por ingeniería de la invención proporcionan mejores reactivos para inmunoterapia para tratar a pacientes, independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Las moléculas de diacuerpo modificadas por ingeniería de acuerdo con la invención se analizan mediante ADCC usando una estirpe celular cultivada o células PMBC derivadas del paciente para determinar la capacidad de las mutaciones Fc para potenciar la ADCC. La técnica ADCC convencional se realiza usando los métodos que se desvelan en el presente documento. Se recogen linfocitos de sangre periférica usando un gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia). Células diana, es decir, las estirpes celulares cultivadas o células derivadas del paciente, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con los efectores durante 4 h a 37 °C. El europio liberado es detectado usando un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las moléculas de la invención

para generar la citotoxicidad mediada por los linfocitos NK y establecer qué moléculas pueden ser analizarse con las muestras del paciente y monocitos elutriados. A continuación, se analizan las moléculas de diacuerpo que presenten el potencial más alto para generar la actividad ADCC en un ensayo ADCC usando las PBMC de los pacientes. Como células efectoras, se usan células PBMC de donantes sanos.

5 Por consiguiente, se pueden proporcionar métodos de prevención o tratamiento del cáncer caracterizado por un antígeno del cáncer, modificando por ingeniería la molécula de diacuerpo para que reconozca de manera inmunoespecífica el antígeno del cáncer, de modo que la molécula de diacuerpo sea por sí misma citotóxica (por ejemplo, mediante la reticulación de los receptores de superficie que conducen a la apoptosis o regulación negativa
10 aumentada de señales proliferativas) y/o comprende un dominio Fc, de acuerdo con la invención, y/o media en una o más funciones efectoras (por ejemplo, ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos de acuerdo con la invención son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, puesto que estos tienen una actividad citotóxica (por ejemplo, mayor capacidad de destrucción de las células tumorales y/o mejor, por ejemplo, actividad ADCC o CDC).

15 Los cánceres asociados con un antígeno del cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se una a un antígeno del cáncer y sea citotóxico, y/o haya sido modificado por ingeniería de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento para presentar una función efectora. Por ejemplo, aunque sin limitación, mediante la invención, se pueden tratar o prevenir los cánceres que se asocian con los siguientes antígenos del cáncer: antígeno de carcinoma KS 1/4 pan (Perez *et al.* (1989) "Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding
20 The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker", *J. Immunol.* 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) "Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes", *Cancer Immunol. Immunother.* 33(4):210-216), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.* (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants", *Cancer Res.* 51(2):468-475), fosfato ácido prostático (Tailor *et al.* (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone", *Nucl. Acids Res.* 18(16):4928), antígeno específico de próstata (Henttu *et al.* (1989) "cDNA Coding For
25 The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli *et al.* (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen", *Cancer Res.* 53:227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin *et al.* (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97", *J. Natl. Cancer Inst.* 81(6):445-454), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al.* (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product", *J. Exp. Med.* 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.* (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal
30 Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance", *Cancer* 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.* (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine", *J. Clin. Invest.* 96(1):334-42), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno de glóbulos grasos de leche humana, antígenos asociados con tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms", *Cancer Res.* 52:3402-3408), C017-1A (Ragnhammar *et al.* (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced
35 Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced", *Int. J. Cancer* 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma", *J. Clin. Immunol.* 2:135-140), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, CD19 (Ghetie *et al.* (1994) "Anti-CD 19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest", *Blood* 83:1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff *et al.* (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20", *Blood* 83:435-445), CD33 (Sgouros *et al.* (1993) "Modeling And Dosimetry Of
40 Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia", *J. Nucl. Med.* 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.* (1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen", *J. Immunol.* 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.* (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities", *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.* (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside", *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.* (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers", *Cancer Res.* 53:5244-5250), antígeno superficial celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos víricamente incluyendo virus de tumores de ADN de antígeno T y antígenos de envolturas de virus de tumores de ARN, alfa-fetoproteína de antígeno oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellström *et al.* (1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas", *Cancer Res.* 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20 (Hellström *et al.* (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma", *Cancer Res.* 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de linfocito T de leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) "Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2 y Ab3)", *J. Immunol.* 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal
65

como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.* (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property, *Trends in Biochem. Sci.* 17:359-363), antígeno APO-1 de linfocito humano maligno (Trauth *et al.* (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis", *Science* 245:301-304), antígeno de diferenciación (Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens", *Nature* 314:53-57) tales como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales y endodermo primario, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 encontrados en epitelio mamario, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 encontrado en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E¹ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en el adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor del EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma de colon, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T5A7 encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, Gd₃, D1.1, OFA-1, G_{m2}, OFA-2, G_{d2}, M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 encontrados en embriones en fase de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de linfocitos T de un linfoma de linfocitos T cutáneos (véase, Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy", *Cancer J Sci Am.* 4:62-71).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, los siguientes: leucemias que incluyen, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas incluyendo, pero sin limitación, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitación, mieloma indolente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de significado indeterminado; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo, tales como sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales incluyendo, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma de cerebro primario; cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitación, feocromocitoma y carcinoma corticosuprarrenal; cánceres de tiroides tales como, pero sin limitación, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, incluyendo, pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor de células de los islotes o carcinoide; cáncer hipofisario incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cáncer de ojos incluyendo, pero sin limitación, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres de vagina, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicouterinos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor limfotrofe, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres esofágicos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, hongo (polipoide), ulceración, diseminación superficial, diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres hepáticos incluyendo, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma; colangiocarcinomas, incluyendo, pero sin limitación, de tipo papilar, nodular y difuso; cáncer de pulmón, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres de testículo, incluyendo, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratómico, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiomas y rabdomiosarcoma; cánceres del pene; cánceres bucales incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales incluyendo, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidquístico; cánceres de faringe, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma,

melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral lentiginoso; cánceres renales, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/u uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, 5 carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para más información sobre dichos trastornos, véase, Fishman *et al.* (1985) Medicine, 2ª Ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia; y Murphy *et al.* (1997) Informed Decisions: The Complete Book of 10 Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery. Viking Penguin, Penguin Books EE.UU., Inc., Estados Unidos de América).

Por consiguiente, la invención también es útil en el tratamiento o la prevención de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anómalas, incluyendo (pero sin limitación) los siguientes: carcinoma, incluyendo el de 15 vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, próstata, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rabdomyosarcoma; otros tumores, 20 incluyendo melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres ocasionados por aberraciones de la apoptosis también serían tratados mediante los métodos y las 25 composiciones de la invención. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores de mama, próstata y ovario dependientes de hormonas, y lesiones precancerosas, tales como poliposis familiar adenomatosa y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, el tumor maligno o los cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) o trastornos hiperproliferativos, se tratan y previenen mediante los métodos y las composiciones de la invención en el ovario, vejiga, mama, colon, pulmón, piel, 30 páncreas o útero. En otras realizaciones específicas, el sarcoma, el melanoma o la leucemia se tratan o previenen.

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo)) inhibe o disminuye el crecimiento 35 de células cancerosas en al menos el 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto al crecimiento de células cancerosas en ausencia de dicha molécula de la invención.

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo que contenga múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o parte del mismo)) destruye las células, o inhibe o 40 disminuye el crecimiento de células cancerosas en al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 100 % mejor que la molécula precursora.

45 **5.6.2 ENFERMEDAD AUTOINMUNE Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS**

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden un dominio de unión al epítipo específico de FcγRIIB y/o un dominio Fc variante (o parte del mismo), Modificado por ingeniería de acuerdo con los métodos del 50 presente documento, dominio Fc que presenta mayor afinidad por FcγRIIB y menor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA con respecto al a dominio Fc de tipo silvestre. Las moléculas de la invención con dichas características de unión son útiles para regular la respuesta inmunitaria, por ejemplo, para inhibir la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende restringirse a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la invención con una afinidad por FcγRIIB y/o que comprenden un dominio Fc con una 55 mayor afinidad por FcγRIIB y una menor afinidad por FcγRIIIA y/o FcγRIIA pueden conducir a atenuar la respuesta activadora frente a FcγR y a la inhibición de la capacidad de respuesta celular, y, por tanto, tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune.

La invención también proporciona la molécula de diacuerpo de acuerdo con la invención para el uso en los métodos 60 para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto además comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. El uso puede ser en métodos para la prevención, el tratamiento o el control de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune además comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. El apartado 5.7 proporciona los ejemplos no 65 limitantes de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de las enfermedades autoinmunes que se pueden tratar administrando las moléculas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunes, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, esprúe celiaco-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, artritis juvenil, líquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 y mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, uveítis, Vasculitis tal como vasculitis herpetiforme con dermatitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas. Como se describe en el apartado 2.2.2., algunos trastornos autoinmunes se asocian con un estado inflamatorio. Por lo tanto, existe un solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de los trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o controlarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones víricas o bacterianas crónicas.

Las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico de FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad potenciada por FcγRIIB y una afinidad disminuida por FcγRIIA también pueden usarse para disminuir la inflamación que experimentan los animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, una molécula de la invención reduce la inflamación en un animal en al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, al menos un 50 %, al menos un 45 %, al menos un 40 %, al menos un 35 %, al menos un 30 %, al menos un 25 %, al menos un 20 % o al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal, al que no se haya administrado dicha molécula.

Las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico de FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con afinidad potenciada por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIA también pueden usarse para prevenir el rechazo a trasplantes.

5.6.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

El uso puede ser en métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico de un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En determinadas realizaciones, las moléculas de la invención son tóxicas para un agente infeccioso, potencian la respuesta inmunitaria contra dicho agente o potencian la función efectora contra dicho agente, en comparación con la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse con las moléculas de la invención son ocasionadas por agentes infecciosos incluyendo, pero sin limitación, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Las enfermedades víricas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención en combinación con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las causadas por el virus de la hepatitis de tipo A, hepatitis de tipo B, hepatitis de tipo C, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple de tipo I (VSH-I), herpes simple de tipo II (VSH-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las papeas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades víricas tales como meningitis vírica, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por bacterias incluyen, pero sin limitación, micobacterias *rickettsia*, micoplasma, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (carbunco), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, *Pertissus*, cólera, peste, difteria, clamidia, *S. aureus* y legionela.

Las enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por protozoos incluyen, pero sin limitación, *Leishmania*, *Kokzidiosa*, tripanosoma o malaria.

- 5 Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención en combinación con los métodos descritos en el presente documento, que son ocasionadas por parásitos incluyen, pero sin limitación, *Chlamydia* y *Rickettsia*.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico de un agente infeccioso presentan una función efectora de anticuerpo hacia dicho agente, por ejemplo, una proteína patógena. Los ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a, bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecialis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*), un patógeno (por ejemplo, papovavirus B-linfotrópico (PVL); *Bordatella pertussis*; virus de la enfermedad de Borna (VEB); coronavirus bovino; virus de coriomeningitis; virus del Dengue; un virus, *E. coli*; ébola; ecovirus-1; ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacteria entérica; virus huérfano entérico; enterovirus; virus de leucemia felina; virus de la fiebre aftosa; virus de leucemia del mono gibón (VLMG); bacterias gram-negativas; *Helicobacter pylori*; virus de la hepatitis B (VHB); virus del herpes simple; VIH-1; citomegalovirus humano; coronavirus humano; gripe A, B y C; legionela; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; virus del sarampión; meningococos; morbilivirus; virus de la hepatitis de ratón; virus de la leucemia murina; gammaherpesvirus murino; retrovirus murino; coronavirus murino, virus de la hepatitis de ratón; *Mycobacterium avium-M*; *Neisseria gonorrhoeae*; virus de la enfermedad de Newcastle; Parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; virus de la viruela; *Pseudomonas*; Rotavirus; *Samonella typhiurium*; *Shigella*; estreptococos; virus linfotrópico de linfocitos T 1; virus vaccinia).

25 5.6.4 DESINTOXICACIÓN

El uso puede ser en métodos de desintoxicación en un sujeto expuesto a una toxina (por ejemplo, una molécula farmacológica tóxica) que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico de la molécula farmacológica tóxica. En determinadas realizaciones, la unión de una molécula de la invención a la toxina reduce o elimina el efecto fisiológico adverso de dicha toxina. En otras realizaciones más, la unión de un diacuerpo de la invención a la toxina aumenta o potencia la eliminación, degradación o neutralización de la toxina con comparación con la eliminación, degradación o neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmunotoxicoterapia de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento puede usarse para tratar sobredosis o exposición a fármacos incluyendo, pero sin limitación, digoxina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

5.7 TRATAMIENTO COMBINADO

Las moléculas de la invención se pueden administrar en combinación con otros tratamientos conocidos en la técnica para el tratamiento o la prevención del cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas o intoxicación, incluyendo, pero sin limitación, quimioterapias experimentales y convencionales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedad infecciosa o intoxicación.

Una o más moléculas de la invención pueden administrarse a un mamífero, preferentemente, un ser humano, de manera concurrente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. La expresión "de manera concurrente" no se limita a la administración de los agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino más bien se entiende que una molécula de la invención y el otro agente se administran a un mamífero en un orden y dentro de un intervalo temporal de modo que la molécula de la invención pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un mayor beneficio en comparación si estos fueron administrados de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede administrarse al mismo tiempo o de manera sucesiva en cualquier orden en diferentes puntos temporales; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, estos deben administrarse de manera suficientemente próxima en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía apropiada. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar con menos de 1 hora de diferencia, aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de diferencia.

Pueden administrarse dos o más componentes durante la misma visita del paciente.

5 Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse con aproximadamente de 2 a 4 días de diferencia, con de aproximadamente 4 a 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con aproximadamente de 1 a 2 semanas de diferencia o más de 2 semanas de diferencia. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse en un marco temporal en el que ambos agentes todavía sean activos. Un experto en la materia podría determinar dicho marco temporal determinando la semivida de los agentes administrados.

10 Los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención pueden administrarse de manera cíclica a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un período de tiempo y repitiendo esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir la presentación de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

15 Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de un agente terapéutico o profiláctico por infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3
20 semanas de descanso. El número de ciclos administrados será de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más normalmente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos y más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

25 Los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención pueden administrarse en pautas posológicas metronómicas, por infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación en intervalos constantes sin períodos de descanso. Por lo general, los agentes terapéuticos, en particular, los agentes citotóxicos, se usan a menores dosis. Dichas pautas posológicas comprenden la administración diaria prolongada de dosis relativamente bajas durante períodos de tiempo largos. En realizaciones preferidas, el uso de dosis menores puede reducir al mínimo los efectos secundarios tóxicos y eliminar
30 los períodos de descanso. En determinadas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se administran por infusión a dosis baja prolongada o continua que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 1 mes y a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. El programa de dichas pautas posológicas puede ser optimizado por el
35 oncólogo experto.

40 Los ciclos de tratamiento pueden administrarse de manera concurrente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los agentes terapéuticos por separado, pero en un intervalo temporal de modo que las moléculas de la invención puedan funcionar conjuntamente con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez a la semana en combinación con los demás componentes, que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, las pautas posológicas para los agentes terapéuticos se llevan a cabo de manera concurrente, aunque los agentes terapéuticos no se administren al mismo tiempo ni durante la misma visita del paciente.

45 Cuando se usan en combinación con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de manera aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica. Puede administrarse una molécula de la invención de manera concurrente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. Puede administrarse una molécula de la invención de manera concurrente con uno o más otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas diferentes. Puede administrarse una molécula de
50 la invención antes de o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. La administración de una molécula de la invención puede ser en combinación con otros agentes profilácticos o terapéuticos por la misma vía de administración o diferentes, por ejemplo, oral y parenteral. En determinadas realizaciones, cuando una molécula de la invención se administra de manera concurrente con otro agente profiláctico o terapéutico que pueda producir efectos secundarios adversos incluyendo, pero sin limitación, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que se encuentre por debajo del umbral que genera el efecto secundario
55 adverso.

60 Las cantidades de dosificación y las frecuencias de la administración que se proporcionan en el presente documento están englobadas por las expresiones terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Además, la dosificación y frecuencia normalmente variarán de acuerdo con factores específicos de cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos que se administren, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y el historial médico anterior del paciente. Los regímenes apropiados puede seleccionarlos un experto en la materia considerando dichos factores y siguiendo, por ejemplo, las dosis publicadas en la bibliografía y recomendadas en "Physician's Desk Reference" (56^a ed., 2002).

65

5.7.1 AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

La administración de una o más moléculas de la invención puede ser con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o la prevención del cáncer. Pueden administrarse inhibidores de la angiogénesis combinados con las moléculas de la invención. Los inhibidores de la angiogénesis que pueden usarse incluyen, pero sin limitación: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina antiangiogénica III; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado de cartílago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; heparinasas; fragmento hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); interleucina-12; Kringle 5 (fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de la metaloproteinasa (TIMP); 2-metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); Anticuerpo monoclonal IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; inhibidor de la ribonucleasa placentaria; inhibidor activador del plasminógeno; factor de plaquetas-4 (PF4); Prinomastat; fragmento de 16 kDa de prolactina; proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastat; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; factor de crecimiento transformante-beta (TGF-b); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesil transferasa (FT1); y bisfosfonatos.

Los agentes antineoplásicos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo las composiciones y formas farmacéuticas, y los kits de la invención, incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasas; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisanol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziacuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracil; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiourea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iroplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolido; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomina; perfosfamida; pipobromano; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporetida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros fármacos antineoplásicos incluyen, pero sin limitación: 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno; carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosoprina; derivados de beta-lactama; beta-alelina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidores de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela aviar; capecitabina; carboxamida-amino- triazol; carboximidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinolaxina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisanol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina

B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diazicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; 9-dihidrotaxol; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselena; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texapirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; hexametileno-bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; 4-ipomeanol; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocítico; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos lúcticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario defectuoso; mitoguzona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitoxina de factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal; gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor 1 de tumores múltiples; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacteria; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-benzilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetron; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatin; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perilúctico; fenazinicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxi-etileno-hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de farnesil proteína transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidores de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcófitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a la somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; esculamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámidas; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramin; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante tiroidea; etiopurpurina de etilo y de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre pluripotenciales; inhibidores de la transducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; Inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica eritrocítica; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinixaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimálmero de zinostatina. Los fármacos antineoplásicos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Los ejemplos de los anticuerpos terapéuticos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un inmunosupresor, anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado para la prevención del rechazo de aloinjerto renal agudo; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a de antígeno de superficie celular murino anti-17-IA (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo IgG murino anti-idiotipo (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo de integrina anti- α V β 3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3

humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor del complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- α (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4\beta 7$ (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- $\beta 2$ humano (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse de acuerdo con la invención se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos terapéuticos contra el cáncer

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor del EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomab-itrio-90)	cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Bivatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	MI agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	apoplejía isquémica	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHF	CD20
CRC Technology	Anticuerpo monoclonal, 105AD7 idiopático	vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	Anticuerpo monoclonal, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón no microcítico	NA
Genentech	Herceptina	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptina	cáncer de mama en fase temprana	HER-2
	Rituxan	NHF de grado bajo o folicular recidivante/resistente al tratamiento	CD20
	Rituxan	NHF de grado intermedio o alto	CD20
	Anticuerpo monoclonal-VEGF	NSCFC, metastásico	VEGF
	Anticuerpo monoclonal-VEGF	cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	Fab de AMD	degeneración macular asociada a la edad	CD18
	E-26 (2º gen. IgE)	Asma y rinitis alérgica	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	NHF de linfocitos B, positivo para CD20, folicular de grado bajo, recidivante o resistente al tratamiento y NHF resistente al tratamiento para rituximab	CD20
ImClone	Cetuximab + innotecán	carcinoma colorrectal resistente al tratamiento	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	Cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente	receptor del EGF
	Cetuximab + gemcitabina	carcinoma de páncreas metastásico recién diagnosticado	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico	receptor del EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón no microcítico recién diagnosticado	receptor del EGF

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional incurable, extensa y metástasis distante)	receptor del EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello local, avanzado	receptor del EGF
	BEC2 + Bacilo	carcinoma de pulmón microcítico mimético Calmette Guerin	
	BEC2 + Bacilo Calmette Guerin	melanoma	gangliósido GD3 gangliósido GD3 mimético
	IMC-1C11	cncer colorrectal con metástasis en hígado	receptor del VEGF
ImmonoGen	nuC242-DM1	Cáncer colorrectal, gástrico y de páncreas	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	Linfoma no hodgkiniano	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no hodgkiniano	CD22
	CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de mama (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (obtención de radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (obtención de radioimágenes)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección de tejido blando (obtención de radioimágenes)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfoma (obtención de radioimágenes)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres de células germinales de hígado 7 (obtención de radioimágenes)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	obtención de imágenes colorrectales	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	cáncer de próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (sobreexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxin	Cáncer	$\alpha\beta_3$
Merck KGaA	Anticuerpo monoclonal 425	Diversos cánceres	receptor del EGF
	IS-IL-2	Diversos cánceres	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	Linfoma no hodgkiniano	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	metastásico cáncer	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no hodgkiniano	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno irresecable	proteínas asociadas al ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica)	Cáncer de páncreas	NA
	Anticuerpo monoclonal, Cáncer de pulmón/riñón	Cáncer de pulmón y riñón	NA

Empresa	Producto	Enfermedad	Diana
	nacolumab tafenatox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer de colon y de páncreas	NA
Protein Design Labs	Nuvion	Tumores malignos de linfocitos T	CD3
	SMART M195	LMA	CD33
	SMART 1D10	NHL	antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal, avanzado	CEA
	TriGem	melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAb-G2 radiomarcado Monopharm C	No Hodgkins linfoma	NA
	GlioMAb-H (+ toxina gelonina)	Carcinoma colorrectal y de páncreas	antígeno SK-1
		glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
Xoma	Rituxan	NHL de grado bajo o folicular	CD20
		recidivante/resistente al tratamiento	
	Rituxan	NHL de grado intermedio o alto	CD20
	ING-1	adenomcarcinoma	Ep-CAM

5.7.2 INMUNOMODULADORES Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

5 El uso puede ser en métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas de la invención en combinación con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolímús)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloaminas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de los receptores de linfocitos T y moduladores de los receptores de citocinas.

10 Los agentes antiinflamatorios han presentado resultados satisfactorios en tratamientos de trastornos inflamatorios y autoinmunes y ahora son un tratamiento común y convencional de dichos trastornos. Se puede usar cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios

15 incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, beta-agonistas, agentes anticolinérgicos y metil-xantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por

20 ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de los agentes antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero sin limitación, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

25 Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la invención se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunes se presenta en la **Tabla 10**.

30

Tabla 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Espónsores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo a aloinjertos
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux/Immunotech	Rechazo a aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo a aloinjertos
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
CDP850	E-selectina	Humanizado		Celltech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Apoplejía
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/alergia
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Crohn
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Apoplejía
LDP-01	beta2-integrina	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo a aloinjertos
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunes
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo a aloinjertos
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune

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

Tabla 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunes

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo completamente humano derivado de xenorratón frente al antígeno CBL en linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK
5c8 (un antígeno anticuerpo anti-CD40)	Los ensayos de fase II fueron interrumpidos en octubre del 99, examínense los "efectos adversos"	CD-40
IDEC 131	lupus eritematoso sistémico (LES)	anti CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn, Psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (anti-Acm b7)	enfermedad inflamatoria del intestino enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa	receptor de integrina a4b7 en glóbulos blancos (leucocitos)
anticuerpo anti-interferón gamma SMART	trastornos autoinmunes	Anti-interferón gamma
Verteportin	artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos de la sangre ocasionados por reacciones autoinmunes, Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal contra receptores de FcRI
MDX-CD4	tratar artritis reumatoide y otra autoinmunidad	anticuerpo monoclonal contra la molécula receptora de CD4
VX-497	trastornos autoinmunes esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria del intestino lupus psoriasis	inhibidor de inosina monofosfato deshidrogenasa (la enzima necesaria para preparar nuevo ARN y ADN que se usa en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina 1 beta (la enzima convertora controla las vías que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva)

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
VX-745	específico de la inflamación implicada en la señalización química del inicio de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	inhibidor de P38MAP quinasa, proteína quinasa activada por mitógeno
Enbrel (etanercept)		se dirige a TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL8 (interleucina 8)
Apogen MP4		el antígeno recombinante destruye selectivamente los linfocitos T asociados con la enfermedad, induce la apoptosis los linfocitos T eliminados por muerte celular programada ya no atacan las propias células del organismo; apógenos específicos, linfocitos T específicos de la diana

5.7.3 AGENTES QUE SE USAN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las moléculas de la invención se pueden administrar en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. La invención contempla el uso de las moléculas de la invención en combinación con antibióticos conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación, macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozilo (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxil (Duricef®)), una claritromicina (por ejemplo, claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (por ejemplo, eritromicina (EMycin®)), una penicilina (por ejemplo, penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (por ejemplo, ofloxacino (Floxin®), ciprofloxacino (Cipro®) o norfloxacino (Noroxin®)), antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomomicina), antibióticos de anfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, andhianfenicol), antibióticos de ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftiofano, cefpimizol, cefpiramida y ceftiofano), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactams (por ejemplo, aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefems (por ejemplo, flomoxef y moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbencilina, floxacilina, penamciclina, yodhidrato de penetamato, penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina y fencihicilina potásica), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprim), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de estas (por ejemplo, cinoxacina, clinafloxacino, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil-sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoyodo y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antimicóticos. Los agentes antimicóticos que se pueden usar combinados con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulvina.

Las moléculas de la invención pueden administrarse en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivíricos. Los agentes antivíricos que pueden usarse en combinación con las moléculas de la invención incluyen, pero sin limitación, inhibidores de la proteasa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa y análogos de nucleósido. Los ejemplos de los agentes antivíricos incluyen, pero sin limitación, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscamet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.8 TERAPIA CON VACUNA

También se describe el uso de una composición descrita en el presente documento para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, incluyendo, pero sin limitación, antígenos del cáncer y antígenos de enfermedades infecciosas (cuyos ejemplos se desvelan a continuación). Las composiciones de vacuna

pueden comprender uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria, en las que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad potenciada hacia FcγRIIIA. Las composiciones de vacuna de la invención son particularmente eficaces para generar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora frente al agente antigénico o inmunogénico.

En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna de la invención comprende un virus contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y preferentemente están atenuados. La producción de los virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede realizarse usando los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Se puede formular una vacuna de virus recombinante vivo o una vacuna de virus recombinante inactivado de acuerdo con la descripción. Se puede preferir la vacuna de virus vivo, porque la multiplicación en el hospedador conduce a un estímulo prolongado de clase y magnitud similares al que se produce en las infecciones naturales, y por tanto, confiere una considerable inmunidad de larga duración. La producción de dichas formulaciones de vacuna de virus recombinantes, vivos puede lograrse usando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en el alantoides del embrión de pollo seguido por purificación.

En una realización específica, el virus recombinante es no patógeno para el sujeto al que se le administra. En este sentido, el uso de virus modificados por ingeniería genética con fines vacunales puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (por ejemplo, eliminaciones) en los moldes usados para la transfección pueden proporcionar a los nuevos virus las características de atenuación. Por ejemplo, las mutaciones con cambio de sentido específicas que se asocian con sensibilidad a la temperatura o adaptación al frío pueden prepararse en mutaciones por eliminación. Estas mutaciones deben ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o a la temperatura y las frecuencias de inversión deben ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para modificar por ingeniería virus recombinantes son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se concen técnicas para modificar virus de ARN de hebra negativa, véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 5.166.057.

Como alternativa, se pueden construir virus quiméricos con características “suicidas” para usarlos en las formulaciones de vacuna intradérmicas de la invención. Dichos virus solo pasarían por una o unas cuantas series de replicación dentro del hospedador. Si se usara como vacuna, el virus recombinante pasaría ciclo/s de replicación limitado/s e induciría un nivel de respuesta inmunitaria suficiente, pero no pasaría más en el hospedador humano ni provocaría una enfermedad. Como alternativa, se pueden formular virus inactivados (aniquilados) como se describe en el presente documento. Las formulaciones de vacunas de virus inactivados se pueden preparar usando las técnicas convencionales para “destruir” los virus quiméricos. Las vacunas de virus inactivados están “muertas” en el sentido de que se ha destruido su infectividad. Idealmente, la infectividad del virus se destruye sin afectar a su inmunogenicidad. Con el fin de preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico puede hacerse crecer en cultivo celular o en el alantoides de embriones de pollo, se puede purificar mediante ultracentrifugación zonal, se inactiva con formaldehído o β-propiolactona y se combina.

En determinadas realizaciones, epítomos completamente foráneos, incluyendo los antígenos derivados de otros patógenos víricos o no víricos se pueden modificar por ingeniería en el virus para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmica de la invención. Por ejemplo, los antígenos de virus no relacionados tales como antígenos de parásitos del VIH (gp160, gp120, gp41) (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o micóticos o antígenos tumorales pueden modificarse por ingeniería, obteniéndose la cepa atenuada.

Se puede construir prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga en los virus quiméricos de la invención para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferentemente, las secuencias génicas heterólogas son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferentemente, los epítomos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una variedad de patógenos, o los antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, pueden ser expresados por o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden construirse en virus quiméricos de la invención incluyen, pero sin limitación, hemaglutinina neuraminidasa gripal y paragripal, y glicoproteínas de fusión tales como los genes de HN y F de PIV3 humano. En otra realización más, las secuencias génicas heterólogas que pueden modificarse por ingeniería en los virus quiméricos pueden ser aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de las proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero sin limitación, citocinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina 1, -2, -4, -5, -6, -12, y antagonistas de estos agentes.

También se describen células patógenas o virus, preferentemente virus atenuados, que expresan el anticuerpo variante en su superficie.

También se describe una composición de vacuna que comprende un polipéptido de fusión, en la que un agente antigénico o inmunogénico está operativamente unido a un anticuerpo variante de la invención que tiene una afinidad potenciada por FcγRIIIA. La modificación por ingeniería de los polipéptidos de fusión para su uso en las composiciones de vacuna de la invención se realiza usando los métodos de tecnología de ADN recombinante habituales y están dentro del nivel de conocimientos habituales.

También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto administrando una composición descrita en el presente documento. Preferentemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante de la invención, en el que el anticuerpo variante tiene una mayor afinidad por FcγRIIB. Aunque no se pretende quedar limitado a ningún mecanismo de acción en particular, dichas composiciones son eficaces para inducir tolerancia activando la vía inhibidora mediada por FcγRIIB.

5.9 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

También se describen métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención (es decir, diacuerpos) que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, un dominio Fc. También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejoría de uno o más síntomas asociados a una enfermedad, Trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada, está esencialmente purificada (es decir, esencialmente libre de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente, un mamífero tal como un animal no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono, tal como un macaco cangrejero y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida más, el anticuerpo de la invención es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una composición que comprende las moléculas de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero sin limitación, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, las vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las Publicaciones PCT n.º WO 92/19244; documento WO 97/32572; documento WO 97/44013; documento WO 98/31346; y el documento WO 99/66903.

Las moléculas de la invención se pueden envasar en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad del anticuerpo. Las moléculas de la invención se suministran en forma de polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado libre de agua en un envase cerrado herméticamente, y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferentemente, las moléculas de la invención se suministran en forma de un polvo liofilizado estéril, seco en un envase cerrado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la invención deben almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C en su envase original, y las moléculas deben administrarse en el transcurso de 12 horas, preferentemente, en el transcurso de 6 horas, en el transcurso de 5 horas, en el transcurso de 3 horas o en el transcurso de 1 hora tras su reconstitución. En una realización alternativa, las moléculas de la invención se suministran en forma líquida en un envase cerrado herméticamente que indique la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de las moléculas de la invención se suministra en un envase cerrado herméticamente con al menos 1 mg/ml, más preferentemente, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz para el tratamiento, la prevención o la mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis exacta que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales.

Para los diacuerpos englobados por la invención, la dosis administrada a un paciente normalmente es de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg

a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis y frecuencia de administración de los diacuerpos de la invención se pueden disminuir o modificar potenciando la captación y penetración de los diacuerpos en el tejido mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

5 En una realización, la dosis de las moléculas de la invención administradas a un paciente puede ser de 0,01 mg a 1.000 mg/día si se usa como terapia de un solo agente. En otra realización, las moléculas de la invención se usan combinadas con otras composiciones terapéuticas y las dosis administradas a un paciente son menores que cuando se usan dichas moléculas como terapia de un solo agente.

10 Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesite tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una molécula de la invención, debe prestarse atención en usar materiales a los que no se absorba la molécula.

15 En otra realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular, un liposoma (Véase, Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", *Science* 249:1527-1533); Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibíd.*, pág. 3 17-327; véase, en general, en el mismo lugar).

20 En otra realización más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o un sistema de liberación sostenida. Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan una o más moléculas de la invención. Véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 4.526.938; publicación PCT WO 91/05548; publicación PCT WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760. En una realización, se puede usar una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", *Surgery* 88:507-516; y Saudek *et al.* (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", *N. Engl. J. Med.* 321:574-579). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para obtener liberación controlada de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release. Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance. Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Levy *et al.* (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", *Science* 228:190-192; During *et al.* (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howard *et al.* (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", *J. Neurosurg.* 7(1): 105-112); patente de EE.UU. n.º 5.679.377; patente de EE.UU. n.º 5.916.597; patente de EE.UU. n.º 5.912.015; patente de EE.UU. n.º 5.989.463; patente de EE.UU. n.º 5.128.326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y publicación PCT n.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros que se usan en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), metacrilato de poli(metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-coacetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol de vinilo), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriéndose, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan de acuerdo con Dunn *et al.* (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método en concreto se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo a partir del sistema polimérico. La implantación puede producirse, en general, en cualquier parte del organismo del paciente que necesite el tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de administración sostenida no polimérico, con lo que, como sistema de administración del fármaco, se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto. Tras la implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición hacia el fluido del tejido circundante y el material no polimérico coagulará o precipitará poco a poco, formando una matriz sólida, matriz microporosa (véase el documento US 5.888.533).

60 Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", *Science* 249:1527-1533). S puede usar cualquier técnica conocida por un experto para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 4.526.938; publicaciones internacionales PCT n.º WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating

Emulsions”, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) “Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application”, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; y Lam *et al.* (1997) “Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery”, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760.

5 En una realización específica en la que la composición de la divulgación es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para potenciar la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de EE.UU. n.º 4.980.286) o por inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección o administrándolo en unión a un péptido de tipo homeocaja que se sabe que entra en el núcleo, por ejemplo, Joliot *et al.* (1991) “Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 88:1864-1868), etc. Como alternativa, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión por recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la invención puede incluir un solo tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un sujeto con moléculas de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse una vez al día, dos veces o tres veces al día. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el ciclo del tratamiento específico.

5.9.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

30 Las composiciones descritas en el presente documento incluyen composiciones de fármaco a granel útiles para la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que sean apropiadas para la administración a un sujeto o paciente) que puedan usarse en la preparación de formas farmacéuticas unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico desvelado en el presente documento o una combinación de estos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la invención y un anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un determinado antígeno del cáncer, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que se ha aprobado por parte de un organismo de control del gobierno federal o estatal, o que está listada en la Farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares.

En general, los ingredientes de las composiciones se suministran bien por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

Estas composiciones pueden formularse en sus formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, aquellas formadas con aniones tales como los derivados del ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5

5.9.2 TERAPIA GÉNICA

Los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican las moléculas de la invención pueden administrarse para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, el trastorno o la infección, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que puede expresarse. Los ácidos nucleicos pueden producir su anticuerpo codificado o proteína de fusión que media en un efecto terapéutico o profiláctico.

10

Se puede usar cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica según lo descrito en el presente documento. A continuación, se describen métodos ilustrativos.

15

Para realizar revisiones generales de los métodos para terapia génica, Véase Goldspiel *et al.* (1993) "Human Gene Therapy", *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu *et al.* (1991) "Delivery Systems For Gene Therapy", *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science* 260:926-932; y Morgan *et al.* (1993) "Human Gene Therapy", *Ann. Rev. Biochem* 62:191 -217. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual. Stockton Press, NY (1990).

20

25

Una composición puede comprender ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un hospedador apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente, promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpos y cualquier otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller *et al.* (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.* (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells", *Nature* 342:435-438).

30

35

40

Una composición puede comprender ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión, formando parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa la proteína de fusión en un hospedador apropiado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente, promotores heterólogos, operativamente unidos a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que fomentan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

45

La administración de los ácidos nucleicos en el sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células primero son transformadas con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden administrarse directamente *in vivo*, cuando estas se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede realizar mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante infección, usando vectores retrovíricos defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase la patente de EE.UU. n.º 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en unión a un péptido conocido por entrar en el núcleo, administrándolo en unión a un antígeno sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", *J. Biol. Chem* 262:4429-4432) (que puede usarse para elegir tipos de células que expresen específicamente los receptores), etc. En otra realización, Pueden formarse complejos de ácido nucleico-antígeno en los que el antígeno comprenda un péptido vírico fusogénico para romper endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser la diana *in vivo* para la captación y expresión específica de células, seleccionando como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, publicaciones PCT WO 92/06180; documento

55

60

65

WO 92/22635; documento WO92/20316; documento WO93/14188; documento WO 93/20221). Como alternativa, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación homóloga. (Koller *et al.* (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:8932-8935; y Zijlstra *et al.* (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells", *Nature* 342:435-438).

Pueden usarse vectores víricos que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, se puede usar un vector retrovítico (Véase Miller *et al.* (1993) "Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression", *Meth. Enzymol.* 217:581-599). Estos vectores retrovíticos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que va a usarse en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Se pueden encontrar más detalles acerca de los vectores retrovíticos en Boesen *et al.* (1993) "Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdr I Gene", *Biotherapy* 6:291-302), que describen el uso de un vector retrovítico para suministrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíticos en terapia génica son: Clowes *et al.* (1994) "Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes", *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Keim *et al.* (1994) "Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells", *Blood* 83:1467-1473; Salmons *et al.* (1993) "Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy", *Human Gene Therapy* 4:129-141; y Grossman *et al.* (1993) "Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver", *Curr. Opin. Genetics and Devel.* 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios en los que provocan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de suministro a base de adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no estén en división. Kozarsky *et al.* (1993, "Gene Therapy: Adenovirus Vectors", *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.* (1994, "Lung Gene Therapy: In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium", *Human Gene Therapy*, 5:3-10) demostraron el uso de vectores adenovíticos para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos de uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld *et al.* (1991) "Adenovirus-Mediated Transfer Of A Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In Vivo", *Science* 252:431-434; Rosenfeld *et al.* (1992) "In Vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium", *Cell* 68:143-155; Mastrangeli *et al.* (1993) "Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In Vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer", *J. Clin. Invest.* 91:225-234; Publicación PCT WO94/12649; y Wang *et al.* (1995) "A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions", *Gene Therapy* 2:775-783. En una realización preferida, se usan vectores adenovíticos.

También se han propuesto virus adenoasociados (AAV) para usarlos en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh *et al.* (1993) "Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 y la patente de EE.UU. n.º 5.436.146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a las células de un cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Normalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células luego se siembran bajo selección para aislar aquellas células que hayan captado y estén expresando el gen transferido. Estas células después se suministran a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector vírico o bacteriófago, que contenga las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En este campo, se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en las células (véase, por ejemplo, Loeffler *et al.* (1993) "Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated DNA", *Meth. Enzymol.* 217: 599-618, Cotten *et al.* (1993) "Receptor-Mediated Transport Of DNA Into Eukaryotic Cells", *Meth. Enzymol.* 217:618-644) y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, con la condición de que no se alteren las funciones necesarias para el desarrollo y fisiológicas de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula y preferentemente pueda ser heredado y expresado por su progenie de células.

Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, las células madre o progenitoras hematopoyéticas)

preferentemente pueden administrarse por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

Las células en las que se puede introducir el ácido nucleico para los fines de la terapia génica abarcan cualquier tipo de célula deseada, disponible e incluyen, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular, células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para la terapia génica puede ser autóloga para el sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión se introducen en las células de modo que éstas puedan ser expresadas por las células o su progenie, y las células recombinantes entonces pueden administrarse *in vivo* para un efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se pueda aislar y mantener *in vitro* se puede usar de acuerdo con dicha realización de la presente invención (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple *et al.* (1992) "Isolation Of A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest", *Cell* 7 1:973-985; Rheinwald (1980) "Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes", *Meth. Cell Bio.* 21A:229-254; y Pittelkow *et al.* (1986) "New Techniques For The In Vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns", *Mayo Clinic Proc.* 61:771-777).

En una realización específica, el ácido nucleico que va a introducirse con los fines de la terapia génica puede comprender un promotor inducible operativamente unido a la región codificante, de modo que pueda controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

5.9.3 KITS

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenados con las moléculas de la invención. Además, también se puede incluir uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también en el paquete o kit farmacéutico. También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con dicho recipiente o recipientes puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

También se describen kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas de la invención. En otra realización, un kit comprende además uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento del cáncer, en una o más recipientes. En otra realización, un kit comprende además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con el cáncer. En determinadas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico puede ser un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.10 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA

Las composiciones farmacéuticas, los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento, preferentemente se pueden ensayar *in vitro*, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo de modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de usarlos en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de una composición farmacéutica específica es la deseada incluyen ensayos en cultivos celulares en los que se cultiva una muestra de tejido del paciente, y se expone a o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica, y se observa el efecto de dicha composición en la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Esta prueba permite realizar la identificación de la/s molécula/s profiláctica/s o terapéutica/s más eficaces para cada paciente. En diversas realizaciones específicas, se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos de células implicados en un trastorno autoinmune o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T), para determinar si una composición farmacéutica tiene un efecto deseado en dichos tipos de células.

Pueden ensayarse combinaciones de los agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales apropiados antes de su uso en seres humanos. Dicho sistema de modelos animales incluye, pero sin limitación, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede usar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Pueden ensayarse combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas modelo se usan ampliamente y son bien conocidos por el experto. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden administrarse en dosis repetidas. Algunos aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos

aspectos pueden ser el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos y si dichos agentes pueden administrarse por separado o como una mezcla.

- 5 Los modelos animales preferidos que se usan en los métodos de la divulgación son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresen los FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, puede usarse cualquier modelo de ratón descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.877.396. Los ratones transgénicos que se usan en los métodos incluyen, pero sin limitación, ratones portadores de FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano. Preferentemente, las mutaciones que muestren los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se ensayarán para usarlas en estudios de modelos animales antes de su uso en seres humanos. Pueden prepararse cantidades suficientes de anticuerpos para usarlos en modelos animales usando los métodos descritos anteriormente, por ejemplo, usando sistemas de expresión de mamífero y métodos de purificación desvelados e ilustrados en el presente documento.
- 10
- 15 Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana específica del tumor, basándose en la afinidad y especificidad de los dominios de unión al epítipo de las moléculas de diacuerpo de la invención y en la capacidad del diacuerpo para generar una respuesta inmunitaria (Wu *et al.* (2001) "Mouse Models For Multistep Tumorigenesis", *Trends Cell Biol.* 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales diseñados para ensayar la eficacia de las interacciones de Fc-FcγR humanos. Se pueden usar pares de estirpes de ratones transgénicos FcγRIIIA, FcγRIIIB y FcγRIIA generados en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (mediante un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer center) tales como los enumerados en la siguiente **Tabla 11**.
- 20

Tabla 11: Cepas de ratones

Antecedentes de la cepa	FcR humano
Atímico / CD16A KO	Ninguno
Atímico / CD16A KO	FcγRIIIA
Atímico / CD16A KO	FcγR IIA
Atímico / CD16A KO	FcγR IIA y IIIA
Atímico / CD32B KO	Ninguno
Atímico / CD32B KO	FcγR IIB

- 25 La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales de artritis reumatoide conocidos en la técnica descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty *et al.* (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También se pueden usar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunes para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación de la invención. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.
- 30
- 35 Los principales modelos animales para la artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente usados incluyen: modelos de rata con artritis inducida por adyuvantes, modelos de rata y ratón con artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster con artritis inducida por antígeno, todos descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty *et al.* (eds.), Capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993).
- 40 La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la divulgación puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenanos. La artritis inducida por carragenanos también se ha usado en conejo, perro y cerdo en estudios de artritis o inflamación crónicas. Para determinar la eficacia terapéutica se usa la evaluación histomorfométrica cuantitativa. Los métodos para usar dicho modelo de artritis inducida por carragenanos se describen en Hansra P. *et al.* (2000) "Carrageenan-induced Arthritis In The Rat", *Inflammation*, 24(2): 141-155. También se usan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se sabe y se describe en la técnica.
- 45
- 50 La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas de la divulgación también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenanos en la rata, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. *et al.* (1962) "Carrageenan-Induced Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544-547. Este ensayo se ha usado como examen *in vivo* primario para la actividad antiinflamatoria de la mayoría de los AINE, y se considera predictivo de la eficacia en seres humanos. La actividad antiinflamatoria de los agentes profilácticos o terapéuticos que se va a ensayar se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento del peso de la pata trasera del grupo que se va a ensayar con respecto al grupo de control dosificado con vehículo.
- 55
- Además, se pueden usar modelos animales para la enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias combinadas (Kim *et al.* (1992) "Experimental Colitis In Animal Models", *Scand. J. Gastroentrol.* 27:529-537; Strober (1985) "Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease--An Overview", *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Supl):3S-10S).

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que se pueden inducir en animales. Los polisacáridos sulfatados, incluyendo, pero sin limitación, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos, incluyendo, pero sin limitación, ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) y ácido acético pueden administrarse a animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias del

5

También se pueden usar modelos animales para trastornos autoinmunes para evaluar la eficacia de las terapias combinadas. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunes tales como diabetes de tipo 1, autoinmunidad de la tiroides, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Flanders *et al.* (1999) "Prevention Of Type 1 Diabetes From Laboratory To Public Health", *Autoimmunity* 29:235-246; Rasmussen *et al.* (1999) "Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity", *Biochimie* 81:511-515; Foster (1999) "Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease", *Semin. Nephrol.* 19:12-24).

10

Además, se puede usar cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas desveladas en el presente documento para enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

15

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos de la presente invención se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten altos índices terapéuticos. Aunque es posible usar agentes profilácticos y/o terapéuticos que presenten efectos secundarios tóxicos, ha de tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes al sitio de tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

20

25

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosis de dichos agentes se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método de la invención, puede estimarse inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

30

35

La actividad antineoplásica de las terapias usadas de acuerdo con la presente invención también se puede determinar usando diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer, tal como puede ser el modelo de ratón SCID o ratón transgénico o ratón atímico con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como hámsteres, conejos, conocidos en la técnica y descritos en "Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development" (1999, eds. Fiebig y Burger); "Contributions to Oncology" (1999, Karger); "The Nude Mouse in Oncology Research" (1991, eds. Boven y Winograd); y "Anticancer Drug Development Guide" (1997 ed. Teicher).

40

45

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la invención son modelos de xenoinjerto de ratón. Las estirpes celulares tumorales que pueden usarse como fuente de tumores para el xenoinjerto incluyen, pero sin limitación, células SKBR3 y MCF7, que pueden derivarse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores de erbB2 y prolactina. Las células SKBR3 se han usado habitualmente en la técnica como modelos tumorales de ADCC y xenoinjerto. Como alternativa, se pueden usar células OVCAR3 derivadas de adenocarcinoma de ovario humano como fuente para tumores de xenoinjerto.

50

Los protocolos y las composiciones de la divulgación preferentemente se ensayan *in vitro*, y luego *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usarlos en seres humanos. Los agentes y los métodos terapéuticos se pueden explorar usando células de una estirpe celular tumoral o maligna. Se pueden usar muchos ensayos convencionales en la técnica para evaluar tal supervivencia y/o el crecimiento; por ejemplo, la proliferación de células se puede ensayar midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante el recuento directo de células, detectando los cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como los protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul tripano, la diferenciación se puede evaluar visualmente basándose en los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de redes tubulares en membrana basal tridimensional o la preparación de la matriz extracelular, etc.

55

60

Los compuestos para su uso en terapia se pueden ensayar en sistemas de modelos animales apropiados antes de ensayarlos en seres humanos, incluyendo, pero sin limitación, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales anteriormente descritos. Los compuestos pueden usarse luego en ensayos

65

clínicos apropiados.

Además, puede usarse cualquiera de los ensayos conocidos por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinadas desveladas en el presente documento para el tratamiento o la prevención del cáncer, trastorno inflamatorio o enfermedad autoinmune.

6. EJEMPLOS

6.1 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES

Se construyeron un diacuerpo covalente mono específico y un diacuerpo covalente biespecífico para evaluar las características de producción recombinante, purificación y unión de cada uno. Las moléculas de diacuerpo purificadas por afinidad que se produjeron mediante los sistemas de expresión recombinante descritos en el presente documento se encontraron mediante análisis de SDS-PAGE y SEC que consistían en especies diméricas simples. Los análisis de ELISA y SPR revelaron además que el diacuerpo biespecífico covalente presentaba afinidad por ambos antígenos diana y que podía unirse a ambos antígenos simultáneamente.

Materiales y métodos:

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir cuatro construcciones polipeptídicas, representadas esquemáticamente en la FIG. 2. Construcción 1 (**SEQ ID NO: 9**) compuesta del dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce FcγRIIB, y el dominio VH del anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce FcγRIIIA. Construcción 2 (**SEQ ID NO: 11**) compuesta por el dominio VL del anticuerpo Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. Construcción 3 (**SEQ ID NO: 12**) compuesta por el dominio VL del anticuerpo Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. Construcción 4 (**SEQ ID NO: 13**) compuesta por el dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

PCR y construcción del vector de expresión: Las secuencias codificantes de los dominios VL y VH se amplificaron a partir del ADN molde usando cebadores directos e inversos diseñados para que los productos iniciales de PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de las construcciones polipeptídicas deseadas.

Amplificación inicial por PCR del ADN molde: Aproximadamente 35 ng del ADN molde, por ejemplo, la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 ul de cebadores directos e inversos 10 uM; 2,5 ul de tampón 10x pfuUltra (Stratagene, Inc.); 1 ul de dNTP 10 mM; 1 ul de 2,5 unidades/ul de ADN polimerasa pfuUltra (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta un volumen total de 25 ul se mezclaron suavemente en un tubo de microcentrifugación, y se centrifugaron brevemente en una microcentrifugadora para recogerse la mezcla de reacción en el fondo del tubo. Se realizaron las reacciones de PCR usando el sistema de PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) y los siguientes parámetros: 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C, cada 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; y 72 °C, 1 minuto.

El dominio VL del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de cadena ligera del anticuerpo Hu2B6 usando cebadores directo e inverso **SEQ ID NO: 57** y **SEQ ID NO: 58**, respectivamente. El dominio VH del anticuerpo Hu2B6 se amplificó a partir de cadena pesada del anticuerpo Hu2B6 usando cebadores directo e inverso **SEQ ID NO: 59** y **SEQ ID NO: 60**, respectivamente. El dominio VL del anticuerpo Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena ligera del anticuerpo Hu3G8 usando los cebadores directo e inverso **SEQ ID NO: 57** y **SEQ ID NO: 61**, respectivamente. El dominio VH de Hu3G8 se amplificó a partir de la cadena pesada de Hu3G8 usando cebadores directo e inverso **SEQ ID NO:62** y **SEQ ID NO:63**, respectivamente.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % durante 30 minutos a 120 voltios. Los productos de PCR se cortaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción MinElute GE1 (Qiagen, Inc.).

PCR solapante: Se combinaron los productos iniciales de la PCR como se describe más adelante y se amplificaron usando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación del ADN molde. Los productos de la PCR solapante también se purificaron como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 1, **SEQ ID NO: 9** (mostrada esquemáticamente en la **FIG. 2**), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso **SEQ ID NO:57** y **SEQ ID NO:63**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 2, **SEQ ID NO: 11** (mostrada esquemáticamente en la **FIG. 2**), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso **SEQ ID NO:57** y **SEQ ID NO:60**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 3, **SEQ ID NO: 12** (mostrada esquemáticamente en la **FIG. 2**), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8, y los cebadores directo e inverso **SEQ ID NO:57** y **SEQ ID NO:63**, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 4, **SEQ ID NO: 13** (mostrada esquemáticamente en la **FIG. 2**), se amplificó combinando los productos de

la PCR de las amplificaciones del dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6, y los cebadores directo e inverso **SEQ ID NO:57** y **SEQ ID NO:60**, respectivamente.

- 5 Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, **SEQ ID NO: 57**) y los cebadores inversos de los dominios VH (es decir, **SEQ ID NO:60** y **SEQ ID NO:63**) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de PCR solapante purificados fueron digeridos con endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I, y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos codificantes de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la Tabla 12:

10 **Tabla 12. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO**

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

- 15 **Expresión del polipéptido/diacuerpo:** pMGX0669, que codifica la construcción 1, se cotransfectó con pMGX0667, que codifica la construcción 2, en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para dirigir la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmunoespecífico para FcγRIIB y FcγRIIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). pMGX0666 y pMGX0668, que codifican las construcciones 3 y 4, respectivamente, se cotransfectaron por separado en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), inmunoespecífico para FcγRIIIA (el diacuerpo h3G8) y FcγRIIB (el diacuerpo h2B6), respectivamente. Tras tres días en cultivo, se purificaron los productos secretados del medio condicionado.

- 20 **Purificación:** Los diacuerpos fueron capturados del medio condicionado usando los antígenos pertinentes acoplados a Sepharose 4B activada con CNBr. La resina de Sepharose de afinidad se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Tras la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de la elución. Se eluyeron los diacuerpos de la resina lavada usando glicina 50 mM pH 3,0. Los diacuerpos eluidos fueron inmediatamente neutralizados con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y se concentraron usando un concentrador del tipo de centrifugación. Los diacuerpos concentrados se purificaron además mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 equilibrada en PBS.

- 30 **SEC:** Se usó la cromatografía de exclusión molecular para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos de la columna. El análisis de SEC se realizó en una columna Superdex 200HR 10/30 de GE Healthcare equilibrada con PBS. Para la comparación, se usaron como controles los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~150 kDa), un fragmento Fab (~50 kDa) y un Fv monocatenario (~30 kDa)).

- 35 **ELISA:** La unión de los diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó mediante el ensayo ELISA, como se describe en 5.4.2. Se usaron 50 ul/pocillo de una solución 2 ug/ml de sCD32B-Ig para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4° C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, Se diluyeron CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 o CMD h3G8 en el tampón de bloqueo en una serie de diluciones de factor de dilución de dos para generar un intervalo de concentraciones de diacuerpos, De 0,5 µg/ml a 0,001 µg/ml. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 ul/pocillo de sCD16A-biotina a 0,2 ug/ml a cada pocillo. Se volvió a incubar la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se usaron para la detección 50 ul/pocillo de una dilución 1:5.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Se dejó incubar el conjugado de HRP-estreptavidina durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló usando 80 ul/pocillo del sustrato TMB. Tras una incubación de 10 minutos, se detuvo la reacción DE HRP-TMB añadiendo 40 ul/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO a 450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax, y los resultados se representaron gráficamente usando el software GraphPadPrism 3.03.

- 50 **Ensayo BIAcore:** Los parámetros cinéticos de la unión de los diacuerpos eluidos y purificados se analizaron usando un ensayo BIAcore (BIAcore Instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N. J.) y el software asociado como se describe en el apartado 5.4.3.

- 55 Se inmovilizaron sCD16A, sCD32B o sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (la celda de flujo 2) de una superficie de una microplaca de sensor mediante química de acoplamiento de aminos (mediante la modificación de los grupos carboximetilo con mezcla de NHS/EDC) de modo que, en la superficie, se inmovilizaron aproximadamente 1.000 unidades de respuesta (UR) de cualquier receptor. Después de esto, se “desprotegeron” los ésteres activos que no reaccionaron con una inyección de Et-NH₂. Una vez preparada una superficie apropiada, se hicieron pasar diacuerpos biespecíficos covalentes (CBD h2B6-h3G8) o los diacuerpos monoespecíficos covalentes (CMD h2B6 o CMB h3G8) sobre la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una solución 6,25-200 nM a

un caudal de 70 ml/min. A modo comparativo, también se ensayó el sFv de h3G8.

Una vez recogido todo el conjunto de datos, se ajustaron las curvas de unión resultantes de manera global usando algoritmos de cálculo suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan las constantes K_{on} and K_{off} , a partir de las que se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K_D se deduce como el cociente de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se derivan cada una de las constantes de velocidad en el manual del software BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y disociación se ajustaron por separado. La constante de velocidad de disociación se obtuvo para el intervalo de 32-34 s de la fase de disociación de 180 s; el ajuste de la fase de asociación se obtuvo mediante un modelo de Langmuir 1:1 y se escogió el ajuste de base de acuerdo con los criterios $R_{m\acute{a}x}$ y χ^2 para los diacuerpos biespecíficos y el scFv; para la unión del CMD, se usó un ajuste de analito bivalente.

15 Resultados

El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras reveló que el producto purificado de los sistemas de expresión de CMD h3G8, cada uno de CMD h2B6 y CBD h2B6-h3G8 fue una sola especie con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa (**FIG. 3, carriles 4, 5 y 6, respectivamente**). En condiciones reductoras, el producto purificado de cualquiera de los sistemas de expresión de CMD se desplazó como una sola banda (**carriles 1 y 2**), mientras que el producto purificado a partir del sistema de CBD h2B6-h3G8 fue revelado como 2 proteínas diferentes (**FIG. 3, carril 3**). Todos los polipéptidos purificados a partir del sistema de expresión y visualizados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras migraron a aproximadamente 28 kDa.

El análisis de SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también reveló una sola especie molecular (**FIG. 4B**), eluyéndose cada una en aproximadamente el mismo tiempo que un fragmento Fab de la IgG (~50 kDa) (**FIG. 4A**). Los resultados indican que el producto purificado por afinidad fue un dímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión de CMD y un heterodímero covalente homogéneo para el caso de CBD h2B6-h3G8.

Se usó un ensayo ELISA de tipo sándwich para ensayar la unión de CBD h2B6-h3G8 para determinar la especificidad hacia cualquiera o ambas moléculas CD32B y/o CD16A (**FIG. 5**). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2B6-h3G8 heterodimérico tenía especificidad hacia ambos antígenos. Ensayos similares del CMD h3G8 (que no se unió a CD32B) no mostraron señal alguna.

El análisis de SPR indicó que el CMD h3G8 reconoció de manera inmuno-específica sCD16, pero no sCD32B, que el CMD h2B6 reconoció de manera inmuno-específica sCD32B, pero no sCD16, y que el CBD h2B6-h3G8 reconoció de manera inmuno-específica ambas moléculas sCD16 y sCD32B (**FIG. 6A-B**). Ninguno de los diacuerpos ensayados se unió al receptor de control, sCD32A (**FIG. 6C**).

El análisis de SPR también se usó para estimar las constantes cinéticas y de equilibrio de los CMD y del CBD h2B6-h3G8 hacia sCD16 y/o sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un fragmento scFv de h3G8. Las **FIG. 7A-E** muestran los resultados gráficos del análisis de SPR. Las velocidades cinéticas de asociación y disociación, así como la constante de equilibrio, calculadas a partir de los resultados que se representan en la **FIG. 7** se proporcionan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Constantes cinéticas y de equilibrio calculadas a partir de los datos BIAcore.

Receptor/Analito	k_{on}	K_{off}	K_d
Diacuerpo sCD16/h3G8	$2,3 \times 10^5$	0,004	18,0
CBD sCD16/h2B6-h3G8	$4,6 \times 10^5$	0,010	22,7
scFv de sCD16/h3G8	$3,2 \times 10^5$	0,013	38,7
CBD sCD32B / h2B6-h3G8	$3,6 \times 10^5$	0,005	15,0
Diacuerpo sCD32B / h2B6	$6,2 \times 10^5$	0,013	21,0

De acuerdo con los resultados de los análisis de ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 conservó la especificidad hacia CD32B y CD16, y fue capaz de unirse a ambos antígenos simultáneamente. La molécula se representa esquemáticamente en la **FIG. 8**.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BIESPECÍFICOS COVALENTES QUE COMPRENEN DOMINIOS Fc

En un esfuerzo por crear una molécula de tipo IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, se modificó uno de los polipéptidos que comprenden la molécula CBD heterodimérica presentada en el Ejemplo 6.1 para que comprendiera además un dominio Fc (creando una cadena 'más pesada' y una 'más ligera', análogas a una cadena pesada y ligera

de un anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica entonces contendría un dominio Fc que se dimerizaría con una molécula homóloga, formando una molécula de tipo IgG tetramérica con tetravalencia (es decir, formada por dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). Curiosamente, dichas moléculas tetraméricas no se detectaron en los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante usando los ensayos funcionales, por ejemplo, analizando los medios condicionados para la unión inmuno-específica a los antígenos diana. En su lugar, solo una molécula dimérica, que comprendía monómeros que consistían en el dominio VL, VH y Fc, se detectó en dichos ensayos funcionales. Para ensayar si la estabilidad de la estructura tetramérica teórica era el problema, los polipéptidos que comprendían el dominio Fc fueron modificados por ingeniería para que comprendieran además una región bisagra, mientras que los polipéptidos que comprendían la cadena 'más ligera' fueron modificados por ingeniería para que comprendieran además los 6 aminoácidos C-terminales del dominio constante de cadena ligera kappa humana. Cuando dichas cadenas 'más pesada' y 'más ligera' que se volvieron a modificar por ingeniería se coexpresaron en los sistemas de expresión recombinante, los ensayos funcionales detectaron moléculas de diacuerpo que eran capaces de unirse de manera inmuno-específica a los antígenos diana y los anticuerpos anti-Fc.

15 **Materiales y métodos**

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 que se presentan en el Ejemplo 6.1. La construcción 5 (SEQ ID NO: 14) y 6 (SEQ ID NO: 15), se crearon modificando por ingeniería las construcciones 1 y 2, respectivamente, para que comprendieran además un dominio Fc. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se creó modificando por ingeniería la construcción 1 para que comprendiera además la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) en su extremo C-terminal. La construcción 8 (SEQ ID NO: 18) se creó modificando por ingeniería la construcción 2 para que comprendiera además una región bisagra y un dominio Fc (que comprendía la mutación V215A). La representación esquemática de las construcciones 5-8 se encuentra en la FIG. 9.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 Los plásmidos pMGX0669 y pMGX0667 sirvieron como moldes para las secuencias codificantes de las construcciones 1 y 2, respectivamente. Las secuencias codificantes para el dominio Fc y/o el dominio bisagra de HulgG fueron SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN molde se amplificaron usando cebadores directos e inversos para que los productos de PCR tuvieran secuencias solapantes, permitiendo a la PCR solapante generar las secuencias codificantes de los productos deseados.

La secuencia codificante de la construcción 1 se amplificó a partir de pMGX0669 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 64, respectivamente. La secuencia codificante de la construcción 2 se amplificó a partir de pMGX0667 usando cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 65, respectivamente. El bisagra-Fc de HulgG se amplificó usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68, respectivamente. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se amplificó a partir de pMGX0669 usando los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 69.

PCR solapante: Los productos iniciales de PCR se combinaron como se describe más adelante, y se amplificaron y se purificaron como se describe en el Ejemplo 6.1.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 5, SEQ ID NO: 14 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 1 y Fc de HulgG, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:66, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 6, SEQ ID NO: 15 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y Fc de HulgG, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:66, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 8, SEQ ID NO: 18 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), se amplificó combinando los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y el bisagra-Fc de HulgG, y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO:57 y SEQ ID NO:68, respectivamente.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. El plásmido codificante de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la **Tabla 14:**

Tabla 14. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-bisagra hu-Fc (A215V)

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Se hicieron cuatro cotransfecciones por separado en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en el apartado 6.1: pMGX0669 y pMGX0674, que codifican las construcciones 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codifican las construcciones 2 y 5, respectivamente; pMGX0677 y pMGX0678, que codifican las construcciones 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetraavalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico de FcγRIIB y FcγRIIIA. También se realizó una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codifican las construcciones 6 y 5, respectivamente. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada mediante análisis de ELISA anti-Fc de IgG usando el Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones del producto en las muestras basándose en la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente. A menos que se indique de otro modo, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Resultados

Se usó un ensayo ELISA para ensayar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), las construcciones 2 y 5 (pMGX667-pMGX676) y las construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para la expresión de moléculas de diacuerpo con capacidad para la unión simultánea a CD32B y CD16A (**FIG. 10**). Los datos del ensayo ELISA indicaron que la cotransfección con las construcciones 1 y 6 y la cotransfección con las construcciones 2 y 5 no pudieron producir un producto que pudiera unirse a cualquiera o ambos antígenos (**FIG. 10**, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la cotransfección de las construcciones 5 y 6 condujo a la secreción de un producto con capacidad de unión a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto fue un dímero de las construcciones 5 y 6, que contenía un sitio de unión para cada antígeno con una estructura como se representa esquemáticamente en la **FIG. 11**.

Con el fin de impulsar la formación de una estructura heterodimérica de tipo IgG, la secuencia codificante para seis aminoácidos adicionales se anexó al extremo C-terminal de la construcción 1, generando la construcción 7 (**SEQ ID NO: 16** y mostrado esquemáticamente en la **FIG. 9**). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), fueron derivados del extremo C-terminal de la cadena ligera kappa e interactúan normalmente con el dominio bisagra superior de la cadena pesada en una molécula de IgG. A continuación, se modificó un dominio bisagra por ingeniería, obteniéndose la construcción 6, generando la construcción 8 (**SEQ ID NO: 18** y **FIG. 9**). La construcción 8 además comprendía una mutación de aminoácidos en la región bisagra superior, A215V. Los plásmidos de expresión codificantes de la construcción 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, fueron luego cotransfectados en células HEK-293 y expresados como se describe.

Las moléculas de diacuerpo producidas a partir del sistema de expresión recombinante que comprendía las construcciones 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), se compararon en un ensayo ELISA para la unión a CD32B y CD16A a las moléculas de diacuerpo producidas a partir de los sistemas de expresión que comprendían las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674), las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678) y las construcciones 6 y 7 (pMGX677 + pMGX674) (**FIG. 12**).

Como antes, la molécula producida por el sistema de expresión que comprendía las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) demostró incapacidad para unirse a CD32A y CD16A (**FIG. 10** y **FIG. 12**). Por el contrario, el producto de la coexpresión de las construcciones 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la coexpresión de las construcciones 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) pudieron unirse a CD32B y CD16 (**FIG. 12**). Se debe señalar que la construcción 7 es análoga a la construcción 1, a excepción de que la construcción 7 contiene la secuencia C-terminal FNRGEC (**SEC ID NO: 23**); y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, salvo que la construcción 8 comprende un dominio bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de los 6 aminoácidos adicionales a partir del extremo C-terminal de cadena ligera C-kappa (FNRGEC; **SEQ ID NO: 23**) a la cadena 'más ligera' no portadora de Fc ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpo de tipo IgG tetraméricas, independientemente de si la cadena más pesada correspondiente comprendía un dominio bisagra (es decir, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, **FIG. 12**). La adición del dominio bisagra al polipéptido 'más pesado' portador de Fc, sin la adición de la secuencia C-terminal FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**) a la cadena 'más ligera' correspondiente, aparentemente fue incapaz de efectuar una estabilización similar (es decir, ausencia de unión por el producto de la cotransfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérica se representa esquemáticamente en la **FIG. 13**.

6.3 EFECTO DEL ORDEN DE LOS DOMINIOS Y ENLACES DISULFURO ADICIONALES EN LA FORMACIÓN DE LA MOLÉCULA DE DIACUERPO DE TIPO IgG TETRAMÉRICA

El efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' de la molécula de diacuerpo de tipo IgG tetramérica se investigó mediante la sustitución de los restos seleccionados en las cadenas

polipeptídicas por cisteínas. Los restos de cisteína adicionales permiten enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas 'más pesada' y 'más ligera'. Además, se investigó el orden de los dominios sobre la actividad de unión moviendo el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc desde el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica al N-terminal. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprendía los enlaces disulfuro adicionales no se modificó con respecto a las moléculas de diacuerpo anteriormente construidas con dichos enlaces, la transferencia del dominio Fc o bisagra-Fc al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica 'más pesada' que comprendía el diacuerpo mejoró sorprendentemente la afinidad de unión y/o la avidez de la molécula biespecífica por uno o ambos de sus antígenos diana.

10 Materiales y métodos

Construcción y diseño de moléculas polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 5, 6 y 8 presentadas en el Ejemplo 6.2. La construcción 9 (SEQ ID NO: 19) y la construcción 10 (SEQ ID NO: 20) (ambas mostradas esquemáticamente en la FIG. 13) fueron análogas a las construcciones 8 y 6, a excepción de que el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc, respectivamente, se desplazó del extremo C-terminal del polipéptido al N-terminal. Además, todos los dominios Fc usados eran dominios Fc de IgG1 de tipo natural. La construcción 11, SEQ ID NO:21, (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 2 del Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal fue diseñado para que comprendiera además la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La construcción 12, SEQ ID NO: 22 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 5 del Ejemplo 6.2, salvo que el dominio Fc comprendía además una región bisagra. Además, para las construcciones 11 y 12, el dominio VL de 2B6 y el dominio VH de 2B6 comprendía una sola modificación de aminoácido (G105C y G44C, respectivamente) de modo que una glicina de cada dominio se reemplazó por cisteína.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6.2.

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados usando los métodos que se describen en el Ejemplo 6.1 y el Ejemplo 6.2.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. El plásmido codificante de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la **Tabla 15**:

Tabla 15. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
9	pMGX0719	Bisagra hu/Fc -hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc -hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-bisagra hu-FC
12	pMGX0717	Hu3G8VF-hu2B6VH (G/C)-FNRGEC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Se realizaron tres cotransfecciones diferentes en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en el apartado 6.1: pMGX0669 y pMGX0719, que codifican las construcciones 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, que codifican las construcciones 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, que codifican las construcciones 11 y 12, respectivamente. La cotransfección de estos dos plásmidos fue diseñada para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura de tipo IgG, inmunoespecífico de FcγRIIB y FcγRIIIA. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado fue cuantificada mediante análisis de ELISA anti-Fc de IgG usando el Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones del producto en las muestras basándose en la cuantificación, y las muestras normalizadas se usaron para los ensayos restantes.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente. A menos que se indique de otro modo, se usó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Transferencia Western: Se analizaron aproximadamente 15 ml de medio condicionado procedente de las tres cotransfecciones anteriormente descritas mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se tiñó un gel con Simply Blue Safestain (Invitrogen) y se transfirió un gel idéntico a membranas de PVDF (Invitrogen) usando métodos de transferencia convencionales. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5 % en 1 x PBS. Luego se incubó la membrana en 10 ml de los fragmentos H+L de anticuerpo de cabra anti-IgG1 humana, conjugados con HRP, diluidos 1:8.000 en leche desnatada en polvo al 2 % en 1 x PBS/Tween 20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 1 h con agitación suave. Tras un lavado con 1 x PBS/Tween 20 al 0,3 %, 2 x 5 min cada uno, luego 20 min a temperatura ambiente, se reveló la membrana con el sistema de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La película se reveló en un

procesador de rayos X.

Resultados

5 Los medios condicionados de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 1 y 9; las construcciones 1 y 10; y las construcciones 11 y 12 se analizaron mediante SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y análisis de transferencia Western (usando un anticuerpo anti-IgG como sonda). La transferencia Western reveló que el producto de los sistemas que comprendían las construcciones 11 y 12 o que comprendían las construcciones 9 y 1 formaron principalmente una sola especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (transferencia Western, carriles 3 y 2, respectivamente). Ambos productos tienen enlaces disulfuro internos modificados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada' que comprenden el diacuerpo. Por el contrario, la molécula sin enlaces disulfuro internos modificados por ingeniería entre las cadenas 'más ligera' y 'más pesada', formadas por las construcciones 10 y 1, formaron al menos dos especies moleculares de pesos moleculares aproximados de 75 ~100 kDa (**FIG. 14**, carril 1).

15 A pesar de los resultados de la transferencia Western, se encontró que cada uno de los tres productos fue capaz de unirse a CD32A y CD16 (**FIG. 15**). Sorprendentemente, con respecto al producto que comprendía el dominio bisagra-Fc C-terminal (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en el que el dominio Fc (o el Fc-bisagra) estaba en el extremo amino-terminal de la cadena polipeptídica que comprendía Fc (es decir, la cadena 'más pesada') (construcciones 9+1 y construcciones 10+1) demostró afinidad y/o avidéz potenciada por uno o ambos de sus péptidos diana (es decir, CD32B y/o CD16).

6.4 EFECTO DEL SITIO DE ESCISIÓN INTERNO/EXTERNO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA Y LA EXPRESIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE; DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DEL DIACUERPO BIESPECÍFICO QUE COMPRENDE PARTES DE LA CADENA LAMBDA Y EL DOMINIO BISAGRA DE IgG HUMANA

30 Como se describe en el presente documento, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o la molécula de diacuerpo de la invención pueden expresarse como una sola molécula precursora de poliproteína. Se ensayó la capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los Ejemplos 6.1-6.3 para procesar apropiadamente y expresar un CBD funcional a partir de dicho precursor de poliproteína modificando por ingeniería un ácido nucleico para que codificara tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de un CBD separadas por un sitio de escisión interno, en particular, un sitio de escisión de furina. El CBD funcional fue aislado del sistema recombinante que comprendía la molécula precursora de poliproteína.

35 Como se analiza en el Ejemplo 6,3, la adición de los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**), resultó estabilizar la formación del diacuerpo, supuestamente mediante las interacciones entre cadenas potenciadas entre los dominios que comprendían SEQ ID NO: 23 y aquellos dominios que comprendían un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción de tipo cadena lambda/Fc se ensayó en el CBD en el que ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Se modificó una cadena polipeptídica del diacuerpo por ingeniería para que comprendiera la **SEQ ID NO: 23** en su extremo C-terminal; la cadena polipeptídica asociada se modificó por ingeniería para que comprendiera la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**), que fue derivada del dominio bisagra de una IgG. La comparación de este CBD con el compuesto de las construcciones 1 y 2 (del Ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprendía los dominios derivados del dominio bisagra y la cadena lambda mostraron afinidad ligeramente mayor por uno o ambos de sus epítomos diana.

Materiales y métodos

50 • **Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas:** Precursor de poliproteína: Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir 2 moléculas precursoras de poliproteína, ambas representadas esquemáticamente en la **FIG. 17**. La construcción 13 (**SEQ ID NO: 97**) compuesta del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 13 se proporciona en la **SEQ ID NO: 98**. La construcción 14 (**SEQ ID NO: 99**) (**FIG. 17**), compuesta del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a mCD32B), un sitio de escisión de furina, un sitio FMD (proteasa C3 del virus de la fiebre aftosa), el dominio VL de 2.4G2 y el dominio VH de 3G8. La secuencia de nucleótidos que codifica la construcción 14 se proporciona en la **SEQ ID NO: 100**.

60 Se diseñaron vectores de expresión de ácido nucleico para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 que se presentan en el Ejemplo 6.1. La construcción 15 (**SEQ ID NO: 101**) (**FIG. 17**) era análoga a la construcción 1 (**SEQ ID NO: 9**), presentada en el Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**). La secuencia del ácido nucleico que codifica la construcción 15 se proporciona en la **SEQ ID NO: 102**. La construcción 16 (**SEQ ID NO: 103**) (**FIG. 17**) era análoga a la construcción 2, que se presenta en el Ejemplo 6.1, salvo que el extremo C-terminal de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**). La secuencia del ácido nucleico que codifica la construcción 16 se

proporciona en **SEQ ID NO: 104**.

PCR y construcción del vector de expresión: Todos los protocolos de PCR y de la purificación de los productos de PCR fueron como se describe en el Ejemplo 6.1 y 6.2.

PCR solapante: Los productos finales fueron construidos, amplificados y purificados usando los métodos que se describen en el Ejemplo 6.1 y el Ejemplo 6.2 con cebadores apropiados.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) como se ha descrito anteriormente. El plásmido codificante de las construcciones fueron diseñados como se identifica en la **Tabla 16**:

Tabla 16. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDO

Construcción codificante	Designación del plásmido	Inserción
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2VH-Furina-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-Hu2B6VH-VEPKSC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: Se realizaron una transfección y una cotransfección en células HEK-293 usando Lipofectamine 2000, como se describe en el apartado 6.1: individual: pMGX0750, que codifica la construcción 13; y cotransfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codifican las construcciones 15 y 16, respectivamente. Tras tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado y el producto secretado se purificó por afinidad como se describe.

ELISA: Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpo secretadas en el medio mediante ELISA de tipo sándwich como se ha descrito anteriormente. Se usó CD32B murino para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se usó CD16A conjugado con HRP como sonda para el producto de la cotransfección de las construcciones 15 y 16. Se usó mCD32B como proteína diana y se usó CD16A conjugado a biotina como sonda para el sistema recombinante que comprendía la construcción 13.

Resultados

Se analizó el medio condicionado de los sistemas de expresión recombinante que comprendían las construcciones 13 mediante ELISA de tipo sándwich. El ensayo ELISA ensayó la unión del CBD para determinar la especificidad a cualquiera o ambas de las moléculas mCD32B y/o CD16 (**FIG. 18**). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. La señal positiva del ensayo ELISA reveló que el CBD h2.4G2-h3G8 heterodimérico producido a partir del precursor de poliproteína tenía especificidad hacia ambos antígenos.

De manera similar, se ensayó el producto purificado generado mediante la cotransfección de los vectores codificantes de las construcciones 15 y 16 en un ensayo ELISA, y se comparó con el producto que comprendía las construcciones 1 y 2 (Ejemplo 6.1). CD32B sirvió como antígeno diana y se usó CD16A como sonda secundaria. Al igual que con el producto compuesto de las construcciones 1 y 2, se encontró que el producto de las construcciones 15 y 16 era capaz de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A. De hecho, el producto de las construcciones 15 y 16 mostró afinidad ligeramente potenciada hacia uno o ambos antígenos diana, es decir, CD32B o CD16A. Esto quizás se deba a la estabilidad y/o a la fidelidad aumentada (con respecto a la interacción del dominio VH-VL de tipo silvestre) de la asociación intercatenaria producida por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (**SEQ ID NO: 23**) y la región bisagra VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**), que está ausente en el producto compuesto de las construcciones 1 y 2.

6.5 USO DE REACTIVOS DE REDIRECCIÓN DE AFINIDAD DOBLE (“DART”) PARA UNIR ENTRE SÍ MÚLTIPLES AFINIDADES

Un aspecto de la presente invención se refiere a nuevos reactivos de redirección de afinidad doble (“DART”), así como nuevas formas para unir entre sí múltiples afinidades. Las moléculas “DART” pueden ser mono-específicas, biespecíficas, triespecíficas, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres o más epítopos diferentes (que pueden ser de antígenos iguales o diferentes). Las moléculas “DART” además pueden ser monovalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes, etc., siendo capaces de este modo de unirse simultáneamente a uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más moléculas. Como se muestra en la **FIG. 35**, estos dos atributos de DART pueden combinarse, por ejemplo, para producir anticuerpos biespecíficos que sean tetravalentes, etc.

Un avance es el desarrollo de una molécula de DART que tenga afinidad por un receptor inmunitario prototipo, huCD32B, así como afinidad por un hapteno, fluoresceína. Esta molécula DART, denominada “2B6/4420”, sirve como adaptador universal, capaz de coligar huCD32B con moléculas que interaccionan con las parejas de unión conjugadas a fluoresceína. CD32B es un receptor de Fc que tiene la capacidad de inactivar señales activadoras en virtud del agrupamiento con complejos inmunitarios de señalización de la activación. En su implementación inicial, esta tecnología permite realizar un examen rápido de diversas dianas biológicas para el agrupamiento con huCD32B sin la

necesidad de generar nuevas construcciones de DART. La molécula de DART 2B6/4420 puede mezclarse simplemente con un anticuerpo marcado con fluoresceína contra un receptor de superficie celular y, con ello, imitar la acción de una molécula DART con afinidad por ese receptor (**FIG. 20**). Además, este reactivo permite la unión eficaz de reactivos de afinidad que no se expresen ni produzcan fácilmente, permitiendo superar limitaciones técnicas. Las moléculas de DART que contienen 2B6/4420 son evidentemente útiles como herramientas de investigación y también como candidatos clínicos. Las moléculas de DART 2B6/4420 producidas a partir de células HEK293 pueden unirse simultáneamente a CD32B y a fluoresceína en un ensayo ELISA. Además, puede inhibir la proliferación celular mediante el reclutamiento de CD32B al complejo BCR a través de la coligación con CD79. El brazo de 2B6 de la molécula de DART puede sustituirse con una secuencia de anticuerpo diferente o una secuencia de unión que tenga otra especificidad importante.

Materiales y métodos:

Construcciones de plásmidos

La molécula 2B6/4420 se deriva de las secuencias del anticuerpo monoclonal Acm 2B6 humanizado (hu2B6, MGA321) y una versión quimérica Fv de ratón/Fc humano del Acm anti-fluoresceína, 4420. El DART completamente ensamblado consiste en dos polipéptidos, que dan lugar a la unión covalente de las dos regiones Fv. El primer polipéptido consiste en una secuencia señal de secreción seguida por el VL de hu2B6 producido como una proteína de fusión con 4420VH separado por un enlazador consisten en los restos de aminoácidos GGGSGGGG. La secuencia FNRGEC, derivada del extremo C-terminal de cadena ligera kappa, se anexa al extremo C-terminal de este polipéptido. El otro polipéptido consiste en la secuencia señal-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, con la secuencia VEPKSC, derivada del extremo C-terminal del fragmento Fd de IgG1 humana, anexado al extremo C-terminal. Las cisteínas en las dos cadenas forman un enlace disulfuro, que une de manera covalente los dos polipéptidos entre sí (**FIG. 20**). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos descritos se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos existentes, se combinaron por PCR solapante y se clonaron en pCIneo (Promega) entre los sitios Nhe I y EcoR I. Por último, se usó como control una molécula de DART con afinidad por huCD32B y huCD16 (2B6/3G8) que se había construido previamente usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales murinos anti-CD79b humano, CB3.1 y CB3.2 (hibridomas) se obtuvieron del Dr. Cooper MD, Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham AL. Se marcaron CB3.1 y CB3.2 con isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford IL). El fragmento F(ab')₂ de una IgG anti-ratón de cabra (GAM), específico del fragmento Fc se obtuvo en Jackson Laboratories (West Grove, PA). El Acm de ratón anti-huCD32B, 3H7, se produjo y purificó de manera interna. El anticuerpo anti-2B6Fv de cabra se produjo inmunizando cabras con el anticuerpo completo hu2B6 y se purificó por afinidad contra la región Fv de hu2B6. Los anticuerpos huIgG, FITC-huIgG y anti-IgG de ratón conjugado a HRP se obtuvieron en Jackson Immunoresearch. El anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP se obtuvo en Southern Biotech.

Expresión de DART

Se cotransfectaron plásmidos codificantes de cada cadena en células 293H (Invitrogen) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína secretada se recogió 3-4 veces en intervalos de tres días y se purificó por cromatografía de líquidos contra una forma soluble inmovilizada de CD32B.

ELISA

Se capturaron las moléculas de DART 2B6/4420 o 2B6/3G8 en placas MaxiSorp (Nalge Nunc) recubiertas con proteína S marcada con FITC (Novagen), IgG humana o FITC-huIgG. La detección se produjo uniendo el ectodominio de CD32B soluble, seguido de 3H7 (un anticuerpo monoclonal de ratón específico de CD32B), y por último, anticuerpo anti-ratón-HRP. Como alternativa, se realizó la detección uniendo un antisuero purificado por afinidad de un anticuerpo policlonal anti-Fv 2B6 de cabra, seguido de anticuerpo anti-cabra-HRP. Se detectó la actividad de HRP usando un sustrato TMB colorimétrico (BioFXy) y se leyó en un lector de placas para ELISA VersaMax.

Purificación y ensayo de la proliferación de los linfocitos B

Se separaron células mononucleares de sangre periférica mediante un método de gradiente de Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech. RU) usando sangre de donantes sanos. Se aislaron los linfocitos B usando el kit Dynal B Cell Negative Isolation (Dynal Biotechnology Inc., NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de los linfocitos B aislados (CD20) fue superior al 90 % como se estimó mediante análisis de FACS. Para el ensayo de proliferación, se sembraron linfocitos B purificados en medio RPMI 1640 completo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano a una densidad celular de 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 200 μ l y se incubaron durante 48 h en presencia y ausencia de anticuerpos y diacuerpos a 37 °C en CO₂ al 5 %. Luego se añadió 1 μ Ci/pocillo de [³H]timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se continuó la incubación durante otras 16-18 h antes de realizar la recogida. La incorporación de [³H]timidina se midió mediante recuento de centello líquido.

Resultados

Para demostrar que la molécula de DART 2B6/4420 era activa y específica se realizaron dos experimentos ELISA. En primer lugar, 2B6/4420 o 2B6/3G8 (como control negativo) se unió a una proteína conjugada con fluoresceína (proteína S) que había sido recubierta sobre placas para ELISA. A continuación, el brazo de 2B6 de DART fue acoplado por CD32B soluble. La unión se detectó mediante otro anticuerpo CD32B con un epítipo que no se solapa con el de 2B6, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a HRP. Aunque DART 2B6/4420 es capaz de unirse simultáneamente a fluoresceína y a CD32B, DART 2B6/3G8 no tiene dicha capacidad (**FIG. 21, Panel A**). Cuando las moléculas de DART se capturan en placas recubiertas con CD32B soluble y se detecta la unión mediante un anticuerpo específico de Fv de hu2B6, ambas moléculas de DART muestran una buena unión. Para demostrar que DART 2B6/4420 fue capaz de unir la fluoresceína conjugada a IgG humana (dado que este es el contexto de la implementación inicial de este reactivo), HulG, no marcado o marcado con fluoresceína, se unió a placas para ELISA y se usó para capturar DART 2B6/4420. De nuevo, se usó DART 2B6/3G8 como control negativo. Se detectó la unión usando un anticuerpo específico de Fv de Hu2B6. DART 2B6/4420 se une claramente a FITC-HulG, pero no se une a HulG no marcado, lo que demuestra que esta molécula de DART es capaz de unir fluoresceína conjugada a un anticuerpo y que no hay unión significativa al anticuerpo solo. Como cabía esperar, no se detectó ninguna unión por parte de DART 2B6/3G8 en ninguno de estos contextos.

Se realizaron experimentos para demostrar que DART 2B6/4420 era capaz de funcionar como reactivo de doble afinidad que podría tener un efecto sobre la señalización en el contexto de un ensayo basado en células. Se ha demostrado que la coagregación de CD32B con BCR inhibe la activación de los linfocitos B. Se exploró la capacidad de DART 2B6/4420 para coocoplarse con CD32B estando el BCR recubierto con anticuerpos aCD79b marcados con fluoresceína y para generar la inhibición de la proliferación celular. Se realizó una selección negativa de linfocitos B de sangre humana y se activaron a través del tratamiento usando concentraciones crecientes de anticuerpo de ratón anti-CD79b humano marcado con FITC, los clones CB3.1 y CB3.2, y mediante la adición de un fragmento F(ab')₂ de un GAM específico de Fc como reactivo secundario con el fin de reticular el BCR, junto con una concentración fija (5 µg/ml) de DART 2B6/4420 o una cantidad equivalente del DART 2B6/3G8, de este modo se usó como control una molécula que no se dirige a la fluoresceína. La proliferación celular, medida como la incorporación de [³H]-timidina, aumentó con concentraciones crecientes del activador del anticuerpo monoclonal anti-CD79b-FITC en ausencia de las moléculas de DART o en presencia de DART 2B6/3G8 de control. La presencia de DART 2B6/4420 produjo una reducción evidente de la proliferación de los linfocitos B a todas las concentraciones del anticuerpo monoclonal anti-CD79b humano-FITC (**FIG. 22, Paneles A y B y FIG. 23, Panel A**).

No se observó inhibición de la proliferación cuando las linfocitos B recubiertos con CB3.2 no marcado y activados usando las mismas condiciones experimentales se trataron con DART 2B6/4420 demostrando su especificidad hacia su diana (**FIG. 23, Panel B**). Estos datos demuestran que DART 2B6/4420 puede formar reticulación con CD32B y el BCR, y suministrar una señal inhibitoria con capacidad para bloquear la activación de células inducida por el receptor del antígeno.

6.6 DART INMUNOTERAPÉUTICO CONTRA TUMORES MALIGNOS DE LINFOCITOS B QUE EXPRESAN CD32B

En la actualidad, los tumores malignos de linfocitos B se tratan usando el anticuerpo anti-CD20 Rituxan®. Algunos tumores malignos de linfocitos B, no obstante, no expresan CD20 ni se vuelven resistentes a Rituxan. Las moléculas de DART de la presente invención proporcionan una inmunoterapia alternativa capaz de resolver los problemas asociados con el uso del anticuerpo anti-CD20 Rituxan®.

La molécula MGD261 es una molécula de redirección de afinidad doble (DART) que se une a hCD32B (a través del anticuerpo h2B6) y hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

Se ensayó la eficacia (agotamiento de linfocitos B) y seguridad de MGD261 en ratones mCD32^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD32^{-/-} hCD32B⁺ C57B1/6 y mCD32^{-/-} hCD16A⁺ hCD32B⁺ C57B1/6. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 6 inyecciones IV (dos veces a la semana durante 3 semanas). El agotamiento de los linfocitos B se controló mediante FACS. Se controló la seguridad mediante observación al lado de la jaula.

Los datos indican que MGD261 es capaz de producir el agotamiento de los linfocitos B en ratones doblemente transgénicos sin inducir algún efecto secundario significativo.

Datos

Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD32^{-/-}hCD16A⁺, C57B1/6 mCD32^{-/-} hCD32B⁺ y ratones C57B1/6 mCD32^{-/-}hCD16A⁺ hCD32B⁺ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en los días 0, 3, 7, 10, 14 y 17 MGD261 (10, 3, 1 o 0,3 mg/kg), o un anticuerpo irrelevante (hE16 10 mg/kg). Se recogió la sangre en los días -19 (antes de la extracción de sangre), 4, 11, 18, 25 y 32 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

Diseño:

Grupo	Animales		Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)
	N.º	Ratones		
A	4	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺	hE16	10
B	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺	MGD261	10
C	3	mCD32 ^{-/-} hCD32B ⁺	hE16	10
D	3	mCD32 ^{-/-} hCD32B ⁺	MGD261	10
E	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺ hCD32B ⁺	hE16	10
F	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺ hCD32B ⁺	MGD261	10
G	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺ hCD32B ⁺	MGD261	3
H	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺ hCD32B ⁺	MGD261	1
I	5	mCD32 ^{-/-} hCD16A ⁺ hCD32B ⁺	MGD261	0,3

Método para el análisis de FACS:

5 Las muestras de sangre completa se recogieron 18 días antes de la administración de h2B6-h3G8 y 4, 11, 18, 25 y 32 días tras el tratamiento. Se analizaron las muestras de sangre para determinar el efecto de la molécula h2B6-h3G8 sobre el recuento de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para el recuento de linfocitos B, linfocitos T y PMN usando perlas FlowCount, obtenidas de Beckman Coulter. El panel de anticuerpos que se usó para el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

Resultados

15 Los ratones tratados con hE16 o MGD261 (con cualquier concentración) no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento durante el experimento.

20 Se observó el agotamiento de los linfocitos B en los ratones doblemente transgénicos hCD16A y hCD32B. El diacuerpo h2B6-3G8 se acopla a las células efectoras que expresan hCD16A y a los linfocitos B que expresan hCD32B; los acoplamientos fueron necesarios para la destrucción de los linfocitos B. El agotamiento de los linfocitos B no se observó en ratones unitransgénicos (**FIG. 24**). No hubo cambios importantes en los linfocitos T ni en el nivel de PMN durante el estudio.

25 Como otra demostración de la inmunoterapia alternativa de la presente invención, se construyó un sustituto de MGD261, denominado "2.4G2-3G8 DB". La molécula 2.4G2-3G8 DB es una molécula de redirección de doble afinidad (DART) que se une a mCD32B (a través del anticuerpo 2.4G2) y a hCD16A y hCD16B (a través del anticuerpo h3G8).

30 La eficacia (agotamiento de linfocitos B) y seguridad del diacuerpo 2.4G2-3G8 se ensayó en ratones mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-} hCD16A⁺ C57B1/6, mCD16^{-/-} hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺. En este experimento con dosis repetidas, los ratones recibieron 9 inyecciones IP (intraperitoneal) (tres veces a la semana durante 3 semanas). El agotamiento de los linfocitos B se controló mediante FACS. Se controló la seguridad mediante observación al lado de la jaula.

35 Los datos indican que el diacuerpo DB 2.4G2-3G8 es capaz de producir el agotamiento de los linfocitos B en ratones transgénicos hCD16 sin inducir ningún efecto secundario significativo.

Datos

40 Se inyectaron a ratones mCD16^{-/-}, mCD16^{-/-}hCD16A⁺C57B1/6, mCD16^{-/-}hCD16B⁺ y mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺ de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IP en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18 el DB 2.4G2-3G8 (75 ug/ratón) o PBS. Se recogió la sangre en los días -10 (antes de la extracción de sangre), 4, 11 y 18 para el análisis de FACS. Tres veces a la semana se registró el estado de salud y la actividad de los animales.

Grupo	N.º de animales	Dosis µg/ms	Artículo de ensayo	Vía	Puntos temporales de extracción de sangre
A	2 mCD16 ^{-/-}	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16 ^{-/-} 16A+B6	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16 ^{-/-} 16B ⁺	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
D	2 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ 16B ⁺	-	PBS	IP	Días -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16 ^{-/-}	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
F	6 mCD16 ^{-/-} 16A+B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
G	6 mCD16 ^{-/-} 16B ⁺	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18
H	6 mCD16 ^{-/-} 16A ⁺ 16B ⁺	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Días -10, 4, 11, 18

Método para el análisis de FACS:

Se extrajeron muestras de sangre completa 10 días antes de la administración de la molécula 2.4G2-3G8 y 4, 11 y 18 días después de iniciarse el tratamiento. Se analizaron las muestras de sangre para determinar el efecto de la molécula 2.4G2-3G8 sobre el recuento de linfocitos B mediante un ensayo basado en FACS. Se usó un protocolo sin lavado para el recuento de linfocitos B, linfocitos T y PMN usando tubos TruCOUNT, obtenidos en BD Immunocytometry System. El panel de anticuerpos que se usó para el análisis fue 1A8-FITC para PMN, CD3-PE para linfocitos T, CD19-APC para linfocitos B y CD45-PerCP para leucocitos totales.

10 Resultados

Los ratones tratados con hE16 o 2.4G2-3G8 no mostraron ningún signo de malestar en ningún momento durante el experimento.

15 Se observó el agotamiento de los linfocitos B en los ratones mCD16^{-/-} hCD16A⁺ o mCD16^{-/-} hCD16A⁺ hCD16B⁺, pero no en los ratones mCD16^{-/-}. Estos datos indican que las células efectoras que portan hCD16A fueron necesarias para la destrucción de los linfocitos B (**FIG. 25**). No hubo cambios importantes en los linfocitos T ni en el nivel de PMN durante el estudio.

20 Modelo intravenoso (IV)

Se ensayó la actividad antitumoral de la molécula MGD261 usando un modelo intravenoso (IV) de la estirpe celular tumoral humana Raji. La estirpe celular Raji es una estirpe celular de linfoma de Burkitt humano que expresa hCD32B. Cuando se inyectan por vía intravenosa en ratones mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-}, las células tumorales se localizan en la columna vertebral y producen la parálisis de las patas traseras.

Los datos indican que MGD261 es capaz de bloquear el crecimiento de las células tumorales Raji *in vivo* en ratones mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-}. Los datos indican que MGD261 puede usarse en el tratamiento de tumores malignos de linfocitos B que expresen CD32B en los seres humanos.

30 Datos

Se inyectaron a ratones C57B1/6 mCD16^{-/-}, hCD16A⁺, RAG1^{-/-} de doce a veinte semanas de vida de la colonia de reproducción MacroGenics por vía IV en el día 0 5 x 10⁶ células Raji. En los días 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 los ratones también fueron tratados por vía intraperitoneal (IP) con 250, 25 o 2,5 µg de MGD261 o con PBS (control negativo). Después se observó a los ratones a diario y se documentó el peso corporal dos veces a la semana. Los ratones que desarrollaron parálisis de las patas posteriores fueron sacrificados.

40 Resultados

Los ratones tratados con PBS murieron entre el día 25 y el día 50. Los ratones tratados con MGD261 sobrevivieron al menos hasta el día 90 (**FIG. 26**). El aumento de la supervivencia tiene significación estadística. Una comparación de las curvas de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos dio una χ^2 de 96,46 (grados de libertad (df) 9; valor de $p < 0,0001$).

45 6.7 EXPRESIÓN DE DART EN PROCARIOTAS

Se realizaron experimentos para demostrar la capacidad para producir DART en hospedadores no mamíferos. Por consiguiente, se transformó *Escherichia coli* con un plásmido que expresaba DART, y se controló la expresión de DART.

Materiales y métodos:**55 Construcción del plásmido**

3G8 es un anticuerpo monoclonal humanizado contra HuCD16. La molécula de DART descrita en este caso consiste en dos cadenas unidas de manera covalente, cada una de las cuales tiene un dominio VL seguido de un espaciador, luego un VH seguido de un resto de Cys en un buen contexto para formar un enlace disulfuro con la cadena opuesta. La secuencia de DART que codifica 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly-3G8VH-LeuGlyGlyCys se amplificó por PCR a partir de una construcción de expresión eucariota existente y se digirió con las enzimas Nco I y EcoR I. El vector diana fue pET25b (+) (Novagen), que contiene una secuencia líder *peIB* para la secreción en *E. coli*. Antes de la inserción de las secuencias de DART 3G8/3G8, el vector fue modificado de la siguiente manera: En primer lugar, se sustituyó el promotor de T7 con el promotor *lac* de menor actividad con el fin de favorecer la expresión soluble, aunque de menor nivel, de las proteínas bajo su control. Además, se introdujeron dos mutaciones puntuales para eliminar dos codones Met internos presentes al principio del sitio de clonación múltiple (MCS) para favorecer el inicio en el Met presente al principio de la secuencia líder *peIB*. La molécula de DART que se produce con esta construcción consiste

en dos brazos de región V que tienen la misma especificidad, en concreto, HuCD16.

Expresión

- 5 Se transformaron células BL21DE3 (Novagen) con el plásmido pET25b(+) T7-*lac*⁺ 3G8/3G8 y se usó una colonia resistente a la ampicilina para sembrar un caldo de cultivo. Cuando el cultivo alcanzó las 0,5 unidades de DO a 600, se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión. El cultivo se desarrolló a 30 °C durante 2 horas y se recogió medio libre de células.

10 Purificación

- DART 3G8/3G8 se purificó en un proceso de dos etapas usando cromatografía de afinidad y de exclusión molecular. La molécula de DART fue capturada del medio condicionado usando cromatografía de afinidad. Específicamente, CD16A se acopló a Sepharose 4B (GE Healthcare) activado con CNBr. La resina CD16A-Sepharose se equilibró en 15 Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de cargarla. Tras terminar la carga, se lavó la resina con tampón de equilibrado antes de realizar la elución de DART unido con glicina 50 mM a pH 3,0. La molécula de DART eluida se neutralizó de inmediato con Tris/HCl 1 M pH 8,0 y se concentró usando un concentrador de tipo centrifugación (Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.). La molécula de DART concentrada además se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS.

20 Resultados

- 1,7 litros del medio condicionado con el cultivo de *E. coli* fueron procesados a través de la columna CD16A-Sepharose. El rendimiento de DART fue de 0,12 mg. El análisis de DART purificado por SDS-PAGE y SEC demostró una 25 compatibilidad con la molécula de DART de control expresada en células de mamífero (CHO) (FIG. 27).

Ensayo de unión de ELISA para la molécula de DART h3G8-h3G8 expresada en *E. coli*

- 30 La expresión de DART h3G8-h3G8 en *E. coli* se midió usando un ensayo de ELISA. Se usaron 50 µl/pocillo de una solución 2 µg/ml del anticuerpo específico de Fv anti-h3G8, 2C11 para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón carbonato a 4 °C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la molécula de DART que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, se diluyeron DART h3G8-h3G8, h2B6-h3G8 y DART h2B6-h2B6 35 (control negativo) expresado en *E. coli* en 1 µg/ml y 0,3 µg/ml en PBST/BSA. Se añadieron 50 µl/pocillo de las moléculas de DART diluidas a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron a la placa 50 µl/pocillo de una solución 0,1 µg/ml de la proteína de fusión sCD16-Fc biotinilada. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se usaron 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló 40 usando 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03 (FIG. 28).

45 6.8 MUERTE DE LINFOCITOS B HUMANOS INDUCIDA POR DART

- Se incubaron células PBMC humanas durante una noche con: CD16-CD32B - hu3G8-hu2b6 (descrito anteriormente); el anticuerpo 2B6 quimérico aglicosilado ch2B6-aglyc (descrito en la solicitud de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente con n.º de serie 11/108.135, publicada como documento US2005/0260213) y CD16-CD79. Las 50 secuencias de ADN y de proteína codificada de CD16-CD79 son las siguientes:

H3G8VL-CB3.1VH

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 105)

GACATCGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA	GAGGGCCACC	60
ATCAACTGCA	AGGCCAGCCA	AAGTGTTGAT	TTTGATGGTG	ATAGTTTTAT	GAAGTGGTAC	120
CAACAGAAAC	CAGGACAGCC	ACCCAAACTC	CTCATCTATA	CTACATCCAA	TCTAGAATCT	180
GGGGTCCCAG	ACAGGTTTAG	TGGCAGTGGG	TCTGGGACAG	ACTTCACCCT	CACCATCAGC	240
AGCCTGCAGG	CTGAGGATGT	GGCAGTTTAT	TACTGTCAGC	AAAGTAATGA	GGATCCGTAC	300
ACGTTCCGGAC	AGGGGACCAA	GCTTGAGATC	AAAGGAGGCG	GATCCGGAGG	CGGAGGCCAG	360
GTCCAAGTGC	AGCAGCCTGG	GGCTGAGCTG	GTGAGGCCTG	GGGCTTCAGT	GAAGCTGTCC	420
TGCAAGGCTT	CTGGCTACAC	CTTCACCAGC	TACTGGATGA	ACTGGGTGAA	GCAGAGGCCT	480
GGACAAGGCC	TTGAATGGAT	TGGTATGGTT	GATCCTTCAG	ACAGTGAAAC	TCACTACAAT	540
CAAATGTTCA	AGGACAAGGC	CACATTGACT	GTTGACAAAT	CCTCCAGCAC	AGCCTACATG	600
CAGCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCGGTCTATT	ACTGTGCAAG	AGCTATGGGC	660
TACTGGGGTC	AAGGAACCTC	AGTCACCGTC	TCCTCAGTTG	AGCCCAAATC	TTGTTAG	717

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:106)

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWFY QQKPGQPPKL
 LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQOSNEDPY
 TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS
 YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM
 QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC

5

CB3.1VL-h3G8VH

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 107)

GATGTTGTGA	TGACCCAGAC	TCCACTCACT	TTGTCCGGTTA	ACATTGGACA	ACCAGCCTCC	60
ATCTCTTGTA	AGTCAAGTCA	GAGCCTCTTA	GATACTGATG	GAAAGACATA	TTTGAATTGG	120
TTGTTACAGA	GGCCAGGCCA	GTCTCCAAAC	CGCCTAATCT	ATCTGGTGTC	TAAACTGGAC	180
TCTGGAGTCC	CTGACAGGTT	CACTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC	240
AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TTTGGAATT	TATTATTGCT	GGCAAGGTAC	ACATTTTCCG	300
CTCACGTTTCG	GTGCTGGGAC	CAAGCTGGAG	CTGAAAGGAG	GCGGATCCGG	AGGCGGAGGC	360
CAGGTTACCC	TGAGAGAGTC	TGGCCCTGCG	CTGGTGAAGC	CCACACAGAC	CCTCACACTG	420
ACTTGTACCT	TCTCTGGGTT	TTCACTGAGC	ACTTCTGGTA	TGGGTGTAGG	CTGGATTTCGT	480
CAGCCTCCCG	GGAAGGCTCT	AGAGTGGCTG	GCACACATTT	GGTGGGATGA	TGACAAGCGC	540
TATAATCCAG	CCCTGAAGAG	CCGACTGACA	ATCTCCAAGG	ATACCTCCAA	AAACCAGGTA	600
GTCTCACAA	TGACCAACAT	GGACCCTGTG	GATACTGCCA	CATACTACTG	TGCTCAAATA	660
AACCCCGCCT	GGTTTGCTTA	CTGGGGCCAA	GGGACTCTGG	TCACTGTGAG	CTCATTCAAC	720
AGGGGAGAGT	GTTAG					735

10

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:108)

DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGFHFP
 LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL
 TSGMGVWIR QPPGKALEWL AHIWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV
 VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC

15

Se ensayó la apoptosis mediante análisis de FACS como el porcentaje de la población PI⁺anexina-V⁺ de linfocitos B (linfocitos CD20⁺) en la población total no regulada por FSC/SSC (**FIG. 29**).

20

6.9 DART 8B5-CB3.1

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

25 La molécula 8B5VL se amplificó usando H9 y Igh630R como cebadores, como molde, se usó ch8B5Lc. CB3.1VH se amplificó usando como cebadores Igh628F e Igh629R, como molde, se usó ch8B5Hc. Se incorporó la secuencia enlazadora a los cebadores Igh630R e Igh628F. El enlazador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados al cebador Igh629R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando H9 e Igh629R como cebadores. El producto de PCR solapado se digirió luego con

endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

5 CB3.1 VL se amplificó usando H9 e Igh630R, que compartía la misma secuencia que 8B5VL en FR4, como cebadores, y como molde, chCB3.1 Lc. 8B5VH se amplificó usando como cebadores Igh631F e Igh640R, y como molde, ch8B5Hc. La secuencia enlazadora fue incorporada a los cebadores Igh630R e Igh631F. El enlazador C-terminal y el codón de terminación fueron incorporados al cebador Igh640R. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh640R. El producto de PCR solapado se digirió luego con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

Marcador anti-flag-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

15 Se insertó un marcador anti-flag entre la secuencia señal y 8B5VL por PCR solapante. La secuencia señal y el marcador Flag se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh647R, y como molde, ch8B5Lc. La molécula 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC se amplificó de nuevo usando como cebadores Igh647F e Igh629R, y como molde, 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando H9 e Igh629R como cebadores. El producto de PCR solapado se digirió luego con endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

20 Para generar un enlazador C-terminal diferente en la construcción 8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC, la construcción se amplificó de nuevo usando como cebadores H9 e Igh646R. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh646R. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

30 Se usó la misma estrategia para crear CB3.1 VL-8B5 VH-LGGC. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R, y se usó como molde CB3.1 VL-8B5 VH-FNRGEC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

Marcador anti-flag-8B5VL-CB3.1VH-LGGC

35 También se usó la misma estrategia para crear el marcador anti-flag -8B5 VL-CB3.1 VH-LGGC. El enlazador LGGC C-terminal fue integrado en el cebador Igh648R, y se usó como molde el marcador anti-Flag-8B5VL-CB3.1 VH-VEPKSC. El producto de PCR se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI y se clonó en el vector pCIneo.

Secuencia

Secuencia de nucleótidos de 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 109):

45 GACATTCAGA TGACACAGTC TCCATCCTCC CTA CTTGCGG CGCTGGGAGA AAGAGTCAGT 60
 CTCAC TTGTC GGGCAAGTCA GGAAATTAGT GGT TACTTAA GCTGGCTTCA GCAGAAACCA 120
 GATGGA ACTA TTAAACGCCT GATCTACGCC GCATCCACTT TAGATTCTGG TG TCCCAAAA 180
 AGGTT CAGTG GCAGTGAGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG TCTTGAGTCT 240
 GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGTCTACAA TATTTTAGTT ATCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA AGGAGGCGGA TCCGGAGGCG GAGGCCAGGT CCAACTGCAG 360
 CAGCCTGGGG CTGAGCTGGT GAGGCCTGGG GCTTCAGTGA AGCTGTCCCTG CAAGGCTTCT 420
 GGCTACACCT TCACCAGCTA CTGGATGAAC TGGGTGAAGC AGAGGCCCTGG ACAAGGCCTT 480
 GAATGGATTG GTATGGTTGA TCCTTCAGAC AGTGAAACTC ACTACAATCA AATGTTCAAG 540
 GAAAGGCCAC ATTGACTGTT GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC 600
 TGACATCTGA GGA CTCTGCG GTCTATTACT GTGCAAGAGC TATGGGCTAC TGGGGTCAAG 660
 GAACCTCAGT CACCGTCTCC TCAGTTGAGC CCAAATCTTG TTAG 704

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 110):

DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA
 ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLO YFSYPLTFGA
 GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN
 WVKQRPGQGL EWIGMVDPST SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS
 LTESDAVYY CARAMGYWQ GTSVTVSSVE PKSC

CB3.1-8B5-FNRGEC

5 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:111):

GATGTTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCACT TTGTCGGTTA ACATTGGACA ACCAGCCTCC 60
 ATCTCTTGTA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GATACTGATG GAAAGACATA TTTGAATTGG 120
 TTGTTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCAAAC CGCCTAATCT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC 180
 TCTGGAGTCC CTGACAGGTT CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTTCC ACTGAAAATC 240
 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TTTGGGAATT TATTATTGCT GGCAAGGTAC ACATTTTCCG 300
 CTCACGTTCC GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGAG GCGGATCCGG AGGCGGAGGC 360
 GAAGTGAAGC TTGAGGAGTC TGGAGGAGGC TTGGTGCAAC CTGGAGGATC CATGAAACTC 420
 TCTTGTGAAG CCTCTGGATT CACTTTTAGT GACGCCTGGA TGGACTGGGT CCGTCAGTCT 480
 CCAGAGAAGG GGCTTGAGTG GGTGCTGAA ATTAGAAACA AAGCTAAAAA TCATGCAACA 540
 TACTATGCTG AGTCTGTGAT AGGGAGGTTT ACCATCTCAA GAGATGATTC CAAAAGTAGT 600
 GTCTACCTGC AAATGAACAG CTTAAGAGCT GAAGACACTG GCATTTATTA CTGTGGGGCT 660
 CTGGGCCCTG ACTACTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCGTT CAACAGGGGA 720
 GAGTGTTAG 729

10 Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 112):

DVVMTQTPLT LSVNIGQPA[~] ISCKSSQSLL DTDGKTYL[~]NW LLQRPQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQ[~]GTHFP
 LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS
 DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS
 VYLQMN[~]SLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFN[~]RG EC

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

15 Se amplificó 8B5VL usando como cebadores H9 e Igh694R, como molde, se usó ch8B5Lc. 8B5VH se amplificó usando como cebadores Igh695F e Igh696R, como molde, se usó ch8B5Hc. La secuencia enlazadora fue incorporada a los cebadores Igh694R e Igh695F. La molécula HulgG1Fc se amplificó usando como cebadores Igh355F e Igh366R, como molde, se usó ch8B5Hc. Los productos de PCR se purificaron en gel y se mezclaron entre sí en una proporción equimolar, luego se amplificaron usando como cebadores H9 e Igh366R. El producto de PCR solapado se digirió luego con las endonucleasas de restricción NheI/EcoRI, y se clonó en el vector pCIneo.

20

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:113):

GACATTCAGA TGACACAGTC TCCATCCTCC CTA[~]CTTGCGG CGCTGGGAGA AAGAGTCAGT 60
 CTC[~]ACTTGTC GGGCAAGTCA GGAAATTAGT GGTTACTTAA GCTGGCTTCA GCAGAAACCA 120
 GATGGA[~]ACTA TTAAACGCCT GATCTACGCC GCATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCCAAAA 180
 AGGTT[~]CAGTG GCAGTGAGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG TCTTGAGTCT 240
 GAAGATTTT[~]G CAGACTATTA CTGTCTACAA TATTTT[~]AGTT ATCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA AGGAGGCGGA TCCGGAGGCG GAGGCCAGGT CCAACTGCAG 360
 CAGCCTGGGG CTGAGCTGGT GAGGCCTGGG GCTTCAGTGA AGCTGTCTCTG CAAGGCTTCT 420
 GGCTACACCT TCACCAGCTA CTGGATGAAC TGGGTGAAGC AGAGGCCTGG ACAAGGCCTT 480
 GAATGGATTG GTATGGTTGA TCCTTCAGAC AGTGAAACTC ACTACAATCA AATGTTCAAG 540
 GACAAGGCCA CATTGACTGT TGACAAATCC TCCAGCACAG CCTACATGCA GCTCAGCAGC 600
 CTGACATCTG AGGACTCTGC GGTCTATTAC TGTGCAAGAG CTATGGGCTA CTGGGGTCAA 660
 GGAACCTCAG TCACCGTCTC CTCACTGGGA GGCTGCTAG 699

25

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:114):

DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQOKP DGTIKRLIYA
 ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA
 GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN
 WVKQRPQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC

CB3.1-8B5-LGGC

5 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 115):

GATGTTGTGA	TGACCCAGAC	TCCA	CTCACT	TTGTCGGTTA	ACATTGGACA	ACCAGCCTCC	60
ATCTCTTGTA	AGTCAAGTCA	GAGCCTCTTA	GATACTGATG	GAAAGACATA	TTTGAATTGG		120
TTGTTACAGA	GGCCAGGCCA	GTCTCCAAAC	CGCCTAATCT	ATCTGGTGTC	TAAACTGGAC		180
TCTGGAGTCC	CTGACAGGTT	CACTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTAC	ACTGAAAATC		240
AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TTTGGGAATT	TATTATTGCT	GGCAAGGTAC	ACATTTTCCG		300
CTCACGTTTCG	GTGCTGGGAC	CAAGCTGGAG	CTGAAAGGAG	GCGGATCCGG	AGGCGGAGGC		360
GAAGTGAAGC	TTGAGGAGTC	TGGAGGAGGC	TTGGTGCAAC	CTGGAGGATC	CATGAAACTC		420
TCTTGTGAAG	CCTCTGGATT	CACTTTTAGT	GACGCCTGGA	TGGACTGGGT	CCGTCAGTCT		480
CCAGAGAAGG	GGCTTGAGTG	GGTTGCTGAA	ATTAGAAACA	AAGCTAAAAA	TCATGCAACA		540
TACTATGCTG	AGTCTGTGAT	AGGGAGGTTT	ACCATCTCAA	GAGATGATTC	CAAAAGTAGT		600
GTCTACCTGC	AAATGAACAG	CTTAAGAGCT	GAAGACACTG	GCATTTATTA	CTGTGGGGCT		660
CTGGGCCCTTG	ACTACTGGGG	CCAAGGCACC	ACTCTCACAG	TCTCCTCGCT	GGGAGGCTGC		720
TAG							723

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:116):

10

DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLWV LLQRPQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YCWQGTHFP
 LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS
 DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS
 VYLQMNLSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC

Cebadores:

Lgh628F (SEQ ID NO:117):

GGAGGCGGATCCGGAGGCGGAGGCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGG

Lgh629R (SEQ ID NO:118)

TTTGAATTCTAACAAAGATTTGGGCTCAACTGAGGAGACGGTGACTGAGG

Lgh630R (SEQ ID NO:119)

GCCTCCGCCTCCGGATCCGCCTCCTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC

Lgh631F (SEQ ID NO:120)

GGAGGCGGATCCGGAGGCGGAGGCCGAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGG

Lgh640R (SEQ ID NO:121)

TTTGAATTCTAACACTCTCCCCTGTTGAACGAGGAGACTGTGAGAGTGG

Lgh644R (SEQ ID NO:122)

TTTGTCGTCATCATCGTCTTTGTAGTCGGAGTGGACACCTGTGGAGAG

15

Lgh646R (SEQ ID NO:123)

TTTGAATTCTAGCAGCCTCCCAGTGAGGAGACGGTGACTGAG

Lgh647F (SEQ ID NO:124)

CAAAGACGATGATGACGACAAAGACATTCAGATGACACAGTCTCC

Lgh648R (SEQ ID NO:125)

TTTGAATTCTAGCAGCCTCCCAGCGAGGAGACTGTGAGAGTGG

Expresión:

- 5 Las construcciones 5 y 6, o 6 y 7, u 8 y 9, o 9 y 10, los plásmidos de expresión codificados (**FIG. 30**) se cotransfectaron en células HEK-293 para expresar el DART 8B5-CB3.1 con o sin marcador anti-flag usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

10 ELISA

- Se realizó el ensayo ELISA de la siguiente manera: Se usaron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato 4° C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión de Fc monocatenaria que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, se diluyó DART 8B5-CB3.1 en una serie de diluciones dobles comenzando con 2 µg/ml. Se transfirieron 25 µl/pocillo de la molécula de DART diluida mezclados con 25 µl/pocillo de ch8B5 a 50 ng/ml de la placa de dilución a la placa para ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo del fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra conjugado a HRP, diluido 1:10.000 45 (Jackson ImmunoResearch) se añadió a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03 (**FIG. 31**).

25 6.10 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DART TETRAVALENTE DE TIPO Ig

- Se emplearon cuatro cadenas polipeptídicas para producir una especie de DART de tipo Ig que tuviera sitios de unión al antígeno tetravalentes (**FIG. 32; FIG. 33**). La especie de DART de tipo Ig tiene propiedades únicas, puesto que sus dominios pueden estar diseñados para unirse al mismo epítipo (para formar una molécula de DART de tipo Ig específica de un epítipo, tetravalente, con la capacidad de unirse a cuatro moléculas de antígeno idénticas), o a diferentes epítopos o antígenos. Por ejemplo, sus dominios pueden diseñarse para unirse a dos epítopos del mismo antígeno (para formar una molécula de DART de tipo Ig específica de dos epítopos, específica de un antígeno, tetravalente) o a epítopos de diferentes moléculas antigénicas para formar una molécula de DART de tipo Ig tetravalente que tenga un par de sitios de unión específicos de un primer antígeno y un segundo par de sitios de unión específicos de un segundo antígeno). Se pueden producir fácilmente moléculas híbridas que tengan combinaciones con dichos atributos.

- Para ilustrar las características de dicha especie de DART de tipo Ig, se produjo una molécula de DART de tipo Ig tetravalente ilustrativa que tenía un par de sitios de unión específicos de CD32 y un segundo par de sitios de unión específicos de CD16A. Esta especie de DART de tipo Ig se produjo usando las cuatro siguientes cadenas polipeptídicas:

Secuencia de nucleótidos de 2.4G2-3G8-hKappa (**SEQ ID NO: 126**):

ES 2 702 087 T3

GATGTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTAAT CTTGCTGCCT CTCCTGGAGA
AAGTGTTTCC ATCAATTGCA AGGCAAGTGA GAGCATTAGC AAGTATTTAG
CCTGGTATCT ACAGAAACCT GGGAAAGCAA ATAAGCTTCT TATGTACGAT
GGGTCAACTT TGCAATCTGG AATTCCATCG AGGTTCAGTG GCAGTGGATC
TGGTACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGAAG CCTGGAGCCT GAAGATTTTG
GACTCTATTA CTGTCAACAG CATTATGAAT ATCCAGCCAC GTTCGGTTCT
GGGACCAAGC TGGAGATCAA AGGAGGCGGA TCCGGAGGCG GAGGCCAGGT
TACCCTGAAA GAGTCTGGCC CTGGGATATT GCAGCCCTCC CAGACCCTCA
GTCTGACTTG TTCTTTCTCT GGGTTTTTAC TGAGGACTTC TGGTATGGGT
GTAGGCTGGA TTCGTCAGCC TTCAGGGAAG GGTCTAGAGT GGCTGGCACA
CATTTGGTGG GATGATGACA AGCGCTATAA TCCAGCCCTG AAGAGCCGAC
TGACAATCTC CAAGGATACC TCCAGCAACC AGGTATTCTC CAAAATCGCC
AGTGTGGACA CTGCAGATAC TGCCACATAC TACTGTGCTC AAATAAACCC
CGCCTGGTTT GCTTACTGGG GCCAAGGGAC TCTGGTCACT GTGAGCTCAC
TGGGAGGCTG CGGCGGAGGG AGCCGTACGG TGGCTGCACC ATCGGTCTTC
ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA TCTGGAAGTCT CCTCTGTTGT
GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA GGCCAAAGTA CAGTGGAAAG
TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC AGGAGAGTGT CACAGAGCAG
GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC AGCACCCCTGA CGCTGAGCAA
AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC CTGCGAAGTC ACCCATCAGG
GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA ACAGGGGAGA GTGTTAG

Secuencia de aminoácidos codificada por 2.4G2-3G8-hKappa (SEQ ID NO: 127):

DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD
GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYQCQQ HYEYPATFGS
GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG
VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA
SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDYSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

5

Secuencia de nucleótidos de 3G8-2.4G2-hGI (SEQ ID NO: 128):

GACACTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA
 GAGGGCCACC ATCTCCTGCA AGGCCAGCCA AAGTGTTGAT TTTGATGGTG
 ATAGTTTTAT GAACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAACCTC
 CTCATCTATA CTACATCCAA TCTAGAATCT GGGATCCCAG CCAGGTTTAG
 TGCCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACCTT CAACATCCAT CCTGTGGAGG
 AGGAGGATAC TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTAATGA GGATCCGTAC
 ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAATA AAAGGAGGCG GATCCGGAGG
 CGGAGGCGAG GTGGAGCTAG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTA GTGCAGCCTG
 GAAGTCCCT GAAACTCTCG TGTGCAGCCT CAGGATTCAC TTTAGTGCAC
 TATTACATGG CCTGGGTCCG GCAGGCTCCA ACGACGGGTC TGGAGTGGGT
 CGCATCCATT AGTTATGATG GTGGTGACAC TCACTATCGA GACTCCGTGA
 AGGGCCGATT TACTATTTCC AGAGATAATG CAAAAGCAG CCTATACCTG
 CAAATGGACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCACTTATT ACTGTGCAAC
 AGAGACTACG GGAATACCTA CAGGTGTTAT GGATGCCTGG GGTCAAGGAG
 TTTAGTGCAC TGTCTCCTCA CTGGGAGGCT GCGGCGGAGG GAGCGCCTCC
 ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA CCCTCCTCCA AGAGCACCTC
 TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC
 CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC TGACCAGCGG CGTGCACACC
 TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT
 GACCGTGCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA GACCTACATC TGCAACGTGA
 ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGAGAGTTGA GCCCAAATCT
 TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG
 GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
 TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
 GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
 TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG
 TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT
 CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
 CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA
 GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT
 CCTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
 GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

Secuencia de aminoácidos codificada por 3G8-2.4G2-hGI (SEQ ID NO: 129):

5 DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVDFDGDSFMNWFY QQKPGQPPKL
 LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQOSNEDPY
 TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD
 YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNAKSSLYL
 QMDSLRS EDT ATYYCATETT GIPTGVMDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS
 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT
 FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS
 CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

Los preparados de moléculas de DART de tipo Ig con las secuencias anteriores se obtuvieron de diferentes aislados de plásmidos y se denominaron "Ig DART 1" e "Ig DART 2". Se comparó la capacidad de estas especies de DART de tipo Ig para unirse a mCD32-hCD16A en un ensayo de ELISA con la del medio solo, una molécula de DART que tenía un solo sitio de unión a CD32 y un solo sitio de unión a CD16A ("DART"), y el anticuerpo Acm anti-ch-mCD32 de control (**FIG. 34**). Se encontró que la molécula de DART de tipo Ig de la presente invención tiene mucho mayor afinidad de unión al antígeno que cualquier DART o anticuerpo de control.

6.11 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIACUERPOS BIESPECÍFICOS CD32B-CD79-1 Y CD32B-CD79-2

Los genes que codifican CD79VL-CD32B VH (Secuencia 1), CD32BVL-CD79VH-1 (Secuencia 2) y CD32BVL-CD79VH-2 (Secuencia 3) se clonaron en el vector de expresión pEE13, obteniéndose las construcciones de expresión 1, 2 y 3, respectivamente. El plásmido de expresión de la construcción 1 se cotransfectó junto con el plásmido de expresión 2 o 3 en células HEK-293 para preparar diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2, respectivamente. El medio condicionado se recogió cada tres días tres veces. El medio condicionado se purificó luego usando la columna por afinidad de CD32B.

Se realizó el ensayo ELISA de la siguiente manera: Se usaron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de CD32B-Fc para recubrir una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4° C durante la noche. Se lavó la placa tres veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,1 %) y luego se bloqueó con BSA al 0,5 % en PBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadir la proteína de fusión de Fc monocatenaria que se iba a ensayar. Durante el bloqueo, se diluyó el diacuerpo biespecífico CD32B-CD79-1 o CD32B-CD79-2 en una dilución en serie de factor de dilución de dos comenzando con 2 µg/ml. Se mezclaron 25 µl/pocillo del diacuerpo biespecífico diluido con 25 µl/pocillo de 50 ng/ml del anticuerpo anti-CD32B, y se añadieron a una placa para ELISA. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras lavar con PBS-T tres veces, se añadieron 50 µl/pocillo del fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra conjugado a HRP, diluido 1:10.000 45 (Jackson ImmunoResearch) se añadió a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó la placa con PBS-T tres veces y se desarrolló con 80 µl/pocillo del sustrato TMB. Tras 5 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1 %. Se leyó la DO450 nm usando un lector de placas de 96 pocillos y el software SOFTmax. Se representó gráficamente la lectura usando el software GraphPadPrism 3.03. El experimento reveló que los diacuerpos biespecíficos CD32B-CD79-1 y CD32B-CD79-2 eran capaces de unirse de manera inmuno-específica a CD32-Fc con una afinidad equivalente a la del anticuerpo de control anti-CD32B. A continuación, se proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificadas de las construcciones descritas anteriormente:

Secuencia 1 - secuencia de nucleótidos de CD79VL-CD32BVH (**SEQ ID NO:130**):

```
GATGTTGTGA TGA CTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCGTCA CCCTTGGACA
GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GATAGTGATG
GAAAGACATA TTTGAATTGG TTT CAGCAGA GGCCAGGCCA ATCTCCAAAC
CGCCTAATTT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC TCTGGGGTCC CAGACAGATT
CAGCGGCAGT GGGTCAGGCA CTGATTTTAC ACTGAAAATC AGCAGGGTGG
AGGCTGAGGA TGTTGGGGTT TATTACTGCT GGCAAGGTAC ACATTTTCCG
CTCACGTTTC GCGGAGGGAC CAAGCTTGAG ATCAAAGGAG GCGGATCCGG
AGGCCGAGGC GAAGTGAAGC TTGAGGAGTC TGGAGGAGGC TTGCTGCAAC
CTGGAGGATC CATGAAACTC TCTTGTGAAG CCTCTGGATT CACTTTTAGT
GACGCCTGGA TGGACTGGGT CCGTCAGTCT CCAGAGAAGG GGCTTGAGTG
GGTTGCTGAA ATTAGAAACA AAGCTAAAAA TCATGCAACA TACTATGCTG
AGTCTGTGAT AGGGAGGTT ACCATCTCAA GAGATGATTC CAAAAGTAGT
GTCTACCTGC AAATGAACAG CTTAAGAGCT GAAGACACTG GCATTTATTA
CTGTGGGGCT CTGGGCCTTG ACTACTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG
TCTCCTCGCT GGGAGGCTGC TAG
```

40 Secuencia 2 - secuencia de aminoácidos de CD79-CD32BVH (**SEQ ID NO: 131**):

ES 2 702 087 T3

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLI DSDGKTYLWV FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGFTHFP
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
LYLQMNLSRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC

Secuencia 3 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-1 (SEQ ID NO:132):

5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC TTATCTGCCT CTGTGGGAGA
TAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGAAATTAGT GGTTACTTAA
GCTGGCTGCA GCAGAAACCA GGCAAGGCC CTAGACGCCT GATCTACGCC

GCATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCCATCC AGGTTTCAGTG GCAGTGAGTC
TGGGACCGAG TTCACCCTCA CCATCAGCAG CCTTCAGCCT GAAGATTTTG
CAACCTATTA CTGTCTACAA TATTTTAGTT ATCCGCTCAC GTTCGGAGGG
GGGACCAAGG TGGAAATAAA AGGAGGCGGA TCCGGAGGCG GAGGCCAGGT
TCAGCTGGTG CAGTCTGGAG CTGAGGTGAA GAAGCCTGGC GCCTCAGTGA
AGGTCTCCTG CAAGGCTTCT GGTTACACCT TTACCAGCTA CTGGATGAAC
TGGGTGCGAC AGGCCCTGG ACAAGGGCTT GAGTGGATCG GAATGATTGA
TCCTTCAGAC AGTGAAACTC ACTACAATCA AATGTTCAAG GACAGAGTCA
CCATGACCAC AGACACATCC ACGAGCACAG CCTACATGGA GCTGAGGAGC
CTGAGATCTG ACGACACGGC CGTGTATTAC TGTGCGAGAG CTATGGGCTA
CTGGGGGCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCACTGGGA GGCTGCTGA

Sequence 4 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-1 (SEQ ID NO:133):

10

DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
ASTLDLGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFYSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTL TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY CARAMGYWQ GTTVTVSSLG GC

Secuencia 5 - secuencia de nucleótidos de CD32BVL-CD79VH-2 (SEQ ID NO:134):

15

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC TTATCTGCCT CTGTGGGAGA
TAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGAAATTAGT GGTTACTTAA
GCTGGCTGCA GCAGAAACCA GGCAAGGCC CTAGACGCCT GATCTACGCC
GCATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCCATCC AGGTTTCAGTG GCAGTGAGTC
TGGGACCGAG TTCACCCTCA CCATCAGCAG CCTTCAGCCT GAAGATTTTG
CAACCTATTA CTGTCTACAA TATTTTAGTT ATCCGCTCAC GTTCGGAGGG
GGGACCAAGG TGGAAATAAA AGGAGGCGGA TCCGGAGGCG GAGGCCAGGT
TCAGCTGGTG CAGTCTGGAG CTGAGGTGAA GAAGCCTGGC GCCTCAGTGA
AGGTCTCCTG CAAGGCTTCT GGTTACACCT TTACCAGCTA CTGGATGAAC
TGGGTGCGAC AGGCCCTGG ACAAGGGCTT GAGTGGATCG GAATGATTGA
TCCTTCAGAC AGTGAAACTC ACTACAATCA AAAGTTCAAG GACAGAGTCA
CCATGACCAC AGACACATCC ACGAGCACAG CCTACATGGA GCTGAGGAGC
CTGAGATCTG ACGACACGGC CGTGTATTAC TGTGCGAGAG CTATGGGCTA
CTGGGGGCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCACTGGGA GGCTGCTGAA
TTC

Secuencia 6 - secuencia de aminoácidos de CD32BVL-CD79VH-2 (SEQ ID NO:135):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQOKP GKAPRRLIYA
 ASTLD SGVPS RFGSGESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCCKAS GYTFTSYWMN
 WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDT S TSTAYMELRS
 LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTT VTVSSLG GC

Listado de secuencias

- 5 <110> Macrogenics, Inc.
 Johnson, Leslie S.
 Huang, Ling
- 10 <120> DIACUERPOS COVALENTES Y USOS DE LOS MISMOS
 <130> 1301.000712
 <140>
 <141>
- 15 <150> 60/945.523
 <151> 21-06-2007
- 20 <150> 60/019.051
 <151> 04-01-2008
 <160> 135
- 25 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
- 30 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> bisagra de IgG1 humana
- 35 <400> 1
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 1 5 10
- 40 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <223> bisagra de IgG2 humana
- 45 <400> 2
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 1 5 10
- 50 <210> 3
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 55 <220>
 <223> bisagra de IgG3 humana

<400> 3

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

5

1		5		10		15									
Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro
			20					25					30		
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu
		35					40					45			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg				
	50					55					60				

<210> 4

<211> 10

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> bisagra de IgG4 humana

15

<400> 4

	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser
	1				5					10

20

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<223> dominio Fc de IgG1

<400> 5

ES 2 702 087 T3

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

<210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> dominio Fc de IgG2

10

<400> 6

ES 2 702 087 T3

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 7
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> dominio Fc de IgG3

10

<400> 7

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

ES 2 702 087 T3

```

                85                90                95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
                100                105                110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
                115                120                125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                130                135                140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                150                155                160
Tyr Asn Thr Thr Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                170                175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
                180                185                190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
                195                200                205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                210                215

```

5 <210> 8
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> dominio Fc de IgG4

<400> 8

```

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

```

15 <210> 9
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción 1 de diacuerpo

5 <400> 9

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

<210> 10

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> enlazador

<400> 10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

20

<210> 11

<211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción 2 de diacuerpo

<400> 11

30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

ES 2 702 087 T3

```

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

```

<210> 12
 <211> 240
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción 3 de diacuerpo

10 <400> 12

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
                20           25           30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
                35           40           45
Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
                100           105           110
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                115           120           125
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130           135           140
Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

```

ES 2 702 087 T3

145					150					155				160	
Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Asn
					165				170					175	
Lys	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Val	Val	Ser	Thr	Ser
			180					185					190		
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
		195					200					205			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Gly	Asp	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Met	Asp
	210					215				220					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Cys
225					230					235					240

<210> 13
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción 4 de diacuerpo

10

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción 5 de diacuerpo

20

<400> 14

ES 2 702 087 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
 115 120 125
 Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
 165 170 175
 Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 180 185 190
 Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
 195 200 205
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 210 215 220
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

455 460

ES 2 702 087 T3

<210> 15
 <211> Todo
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción 6 de diacuerpo

10 <400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
 165 170 175
 Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
 180 185 190
 Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
 210 215 220
 Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245 250 255
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260 265 270
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

ES 2 702 087 T3

	370					375					380				
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
385					390					395					400
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				405					410					415	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
			420					425					430		
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
		435					440					445			
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
	450					455					460				
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
465					470					475					

<210> 16
 <211> 243
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Construcción 7 de diacuerpo

<400> 16

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

15 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 702 087 T3

<223> Enlazador más el extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana

<400> 17

5 Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10

<210> 18

<211> 477

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción 8 de diacuerpo

15 <400> 18

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20           25           30
Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35           40           45
Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65           70           75           80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85           90           95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 100          105          110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115          120          125
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130          135          140
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145          150          155          160
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
 165          170          175
Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
 180          185          190
Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195          200          205
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
 210          215          220
Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 225          230          235          240
Leu Gly Gly Cys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 245          250          255
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 260          265          270
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275          280          285
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290          295          300
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305          310          315          320
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325          330          335

```

ES 2 702 087 T3

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 405 410 415
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 19
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción 9 de diacuerpo

10

<400> 19

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

ES 2 702 087 T3

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
 260 265 270
 Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 275 280 285
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 290 295 300
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 325 330 335
 Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 355 360 365
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 370 375 380
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 385 390 395 400
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
 405 410 415
 Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
 420 425 430
 Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
 435 440 445
 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
 450 455 460
 Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 465 470 475 480
 Ser Leu Gly Gly Cys
 485

<210> 20
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción 10 de diacuerpo

10

<400> 20

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

ES 2 702 087 T3

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
 245 250 255
 Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 260 265 270
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 275 280 285
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 290 295 300
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 305 310 315 320
 Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 325 330 335
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 340 345 350
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 355 360 365
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
 370 375 380
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
 385 390 395 400
 Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
 405 410 415
 Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
 420 425 430
 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
 435 440 445
 Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 450 455 460
 Ser Leu Gly Gly Cys
 465

<210> 21
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción 11 de diacuerpo

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

ES 2 702 087 T3

65					70					75					80
Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Thr	Trp	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys
			115				120					125			
Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
			130				135					140			
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
145				150						155				160	
Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr
				165						170				175	
Asn	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys
			180					185					190		
Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala
			195				200					205			
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
			210				215				220				
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
225					230					235				240	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
				245					250					255	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
			260					265					270		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
			275				280					285			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			290				295				300				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
305					310					315					320
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
				325						330				335	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
			340					345					350		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
			355				360						365		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			370			375						380			
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
385					390					395				400	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
				405					410					415	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
			420					425					430		
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
			435				440					445			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			450			455						460			
Gly	Lys														
465															

<210> 22
 <211> 246
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción 12 de diacuerpo

10 <400> 22

ES 2 702 087 T3

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

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana
 <400> 23

10

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 - CDR1
 <400> 24

20

Asn Tyr Trp Ile His
 1 5

25

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

ES 2 702 087 T3

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 3H7 - CDR1

5 <400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
 1 5

<210> 26
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 - CDR2

15 <400> 26

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

20 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 3H7 - CDR2

<400> 27

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

30 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 - CDR3

40 <400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de 3H7 - CDR3

50 <400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5

55 <210> 30

ES 2 702 087 T3

<400> 30
 000

5 <210> 31
 <400> 31
 000

10 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - CDR1

<400> 32

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

20 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 3H7 - CDR1

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10

30 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - CDR2

40 <400> 34

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

45 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - CDR2

<400> 35

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

55 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 702 087 T3

<223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - CDR2

<400> 36

5 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de 3H7 - CDR2

15 <400> 37

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 38

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - CDR3

<400> 38

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

30 <210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Región variable de la cadena ligera 3H7 - CDR3

<400> 39

40 <210> 40

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<211> 121

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena pesada de 2B6

50 <400> 40

ES 2 702 087 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 - Hu2B6VL-1
 <400> 41

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

15 <210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado - Hu2B6VL-2
 <400> 42

25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

ES 2 702 087 T3

```

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

```

5 <210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado - Hu2B6VL-3

<400> 43

```

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

```

15 <210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *mus* sp.

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 3H7 de ratón

<400> 44

```

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

```

25

ES 2 702 087 T3

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

5 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 45

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
 1 5

15 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 46

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
 1 5

25 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB

35 <400> 47

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
 1 5

40 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 48

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
 1 5

50 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 49

ES 2 702 087 T3

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
 1 5

5 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 50

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
 1 5

15 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 51

25 Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
 1 5

30 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 52

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
 1 5

40 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB
 <400> 53

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
 1 5

50 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB

ES 2 702 087 T3

<400> 54

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

5 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB

<400> 55

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

15 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sitio de unión a IgG del receptor de Fc-gamma-RIIB

25 <400> 56

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

30 <210> 57
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cebador Lgh321F

<400> 57
cgagctagct ctgatgaga tcacagttct ctctac 36

40 <210> 58
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador Lgh318R

<400> 58
gcctccgcct ccggatccgc ctctttgat ctccaccttg gtcctc 47

50 <210> 59
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador Lgh319F

<400> 59
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

60 <210> 60

ES 2 702 087 T3

	<211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador Lgh320R	
	<400> 60 ttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg	43
10	<210> 61 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador Lgh315R	
	<400> 61 gcctccgct ccggatccgc ctctttgat ctcaagcttg gtcccc	46
20	<210> 62 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador Lgh316F	
	<400> 62 ggaggcggat ccggaggcgg aggccagggtt acctgagag agtctggc	48
30	<210> 63 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador Lgh317R	
	<400> 63 ttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc	47
40	<210> 64 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador Lgh339R	
	<400> 64 ctcaacgcag cctcccagtg agctcac	27
50	<210> 65 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador Lgh340R	
	<400> 65 aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c	31
60	<210> 66	
65		

ES 2 702 087 T3

	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador Lgh366R	
	<400> 66	
10	ttgaattct atttaccgag agacagg	27
	<210> 67	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador Lgh367F	
	<400> 67	
20	ctggaggct ggcagagcc caaatctgt gac	33
	<210> 68	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador Lgh368R	
30	<400> 68	
	gtcacaagat ttggctctg cgcagcctcc cag	33
	<210> 69	
	<211> 50	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador Lgh369R	
40	<400> 69	
	ttgaattct aacctctcc cctgtgaag cagcctcca gtgaggagac	50
	<210> 70	
45	<211> 118	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Región variable de la cadena pesada anti-CD16A humanizada (Hu3G8VH-1)	
	<400> 70	

ES 2 702 087 T3

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada anti-CD16A humanizada (Hu3G8VH-5)

<400> 71

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada anti-CD16A humanizada (Hu3G8VH-22)

<400> 72

ES 2 702 087 T3

```

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1          5          10          15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
          20          25          30
Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
          35          40          45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
          50          55          60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65          70          75          80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          85          90          95
Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser
          115

```

5 <210> 73
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera anti-CD16A humanizada (Hu3G8VL-1)

<400> 73

```

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

```

15 <210> 74
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera anti-CD16A humanizada (Hu3G8VL-43)

<400> 74

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
          20          25          30
Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35          40          45

```

25

ES 2 702 087 T3

```

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50                               55                               60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65                               70                               75                               80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                               85                               90                               95
Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                               100                               105                               110

```

5 <210> 75
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera anti-CD16A humanizada (Hu3G8VL-22)

<400> 75

```

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

```

15 <210> 76
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de ADN del enlazador (SEQ ID NO. 10)

<400> 76

ggaggcggat ccggaggcgg aggc

24

25 <210> 77
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Secuencia de ADN del extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana

<400> 77

ttcaacaggg gagagtgt

18

40 <210> 78
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador más el extremo C-terminal de la cadena kappa de IgG humana

<400> 78

ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt

30

5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<223> Dominio bisagra de IgG humana

<400> 79

15

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 80

<211> 18

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20

<220>

<223> Dominio bisagra de IgG humana

25

<400> 80

gttgagccca aatcttgt

18

30

<210> 81

<211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> Dominio VH del anticuerpo 3G8

<400> 81

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35				40						45			
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Gln	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115													

40

<210> 82

<211> 354

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

45

<220>

<223> Dominio VH del anticuerpo 3G8

ES 2 702 087 T3

<400> 82

```
caggttacc tgaagagtc tggcctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagg acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
cagccttcag ggaaggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180
tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240
ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcaaata 300
aaccccgctt ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354
```

5 <210> 83
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada anti-CD16A humanizada (Hu3G8VH-5)

<400> 83

```
caggttacc tgagagagtc tggcctgctg ctgggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60
acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120
cagcctccc ggaaggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180
tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctcaa aaaccaggta 240
gtcctcacia tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300
aaccccgctt ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354
```

15 <210> 84
 <211> 111
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Domino VL del anticuerpo 3G8

25 <400> 84

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

30 <210> 85
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Domino VL del anticuerpo 3G8

<400> 85

ES 2 702 087 T3

```

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
gggatccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggag gggggacca gctggaata aaa 333

```

5 <210> 86
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera anti-CD16A humanizada (Hu3G8VL-1)
 <400> 86

```

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggacca gcttgagatc aaa 333

```

15 <210> 87
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 humanizado
 <400> 87

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
  1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
  20          25          30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
  35          40          45
Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe
  50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
  65          70          75          80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  85          90          95
Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
  100         105         110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
  115         120

```

25 <210> 88
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de 2B6 humanizado
 35 <400> 88

ES 2 702 087 T3

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatacct ctgataactta tccaaattac 180
aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtgc tatccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300
gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

```

5 <210> 89
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 89

```

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

```

15 <210> 90
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de 2B6 humanizado

<400> 90

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccacgc 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccggtcac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

25 <210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sitio de reconocimiento de la escisión de la trombina

35 <400> 91

ES 2 702 087 T3

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1

5

5 <210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión del Factor Xa

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa = Glu o Asp

<400> 92

Ile Xaa Gly Arg
1

20 <210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la enteroquinasa

<400> 93

30 Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

35 <210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la furina

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 3
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 94

Arg Xaa Xaa Arg
1

50 <210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la furina preferido

60 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2

ES 2 702 087 T3

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> 3

<223> Xaa = Lys o Arg

<400> 95

Arg Xaa Xaa Arg

10 1

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de reconocimiento de la escisión de AcTEV

20 <400> 96

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 97

25 <211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 97

Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp
		20						25					30		
Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
					70					75					80
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
				85					90					95	
Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly
			100					105					110		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
	130					135					140				
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
					150					155					160
Thr	Thr	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Gly	Asp
				165					170					175	
Thr	His	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
			180					185					190		
Asn	Ala	Lys	Ser	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu

35

ES 2 702 087 T3

		195						200						205			
Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	Gly	Ile	Pro	Thr		
	210					215					220						
Gly	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
225					230					235					240		
Leu	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Arg	Ala	Lys	Arg	Asp	Val	Gln	Met	Thr	Gln		
			245						250					255			
Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Asn		
			260					265						270			
Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Leu	Gln		
		275						280					285				
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Leu	Met	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Leu		
	290					295					300						
Gln	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
305					310						315				320		
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Leu	Tyr		
				325					330					335			
Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Ala	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr		
			340					345						350			
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Thr		
		355					360						365				
Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser		
	370					375						380					
Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Gly	Met	Gly		
385					390					395				400			
Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala		
				405					410					415			
His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser		
			420					425						430			
Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val	Phe	Leu	Lys		
		435						440					445				
Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln		
	450					455					460						
Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr		
465					470					475				480			
Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Cys											
				485													

<210> 98

<211> 1464

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente (secuencia de ADN de SEQ ID NO. 97)

<400> 98

```

gacactgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat ttgatgggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccagggttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420
tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480
acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tcaactatcga 540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

```

ES 2 702 087 T3

ggaataccta caggtggtat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720
ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaata 780
cttgctgcct ctccctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840
aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtagacat 960
ttcactctca ccatacagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020
cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080
tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140
cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtaggggt 1200
gtaggctgga ttctgcagcc ttcaggggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260
gatgatgaca agcgcataaa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320
tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380
tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt gcttactggg gcccaagggac tctggtcact 1440
gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 99

<211> 511

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente

<400> 99

Asp	Thr	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp
			20					25					30		
Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
	50						55				60				
Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70					75					80
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
				85					90					95	
Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly
			100					105						110	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
	130					135					140				
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
145					150					155					160
Thr	Thr	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Gly	Asp
				165					170					175	
Thr	His	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
			180					185						190	
Asn	Ala	Lys	Ser	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu
		195					200					205			
Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Glu	Thr	Thr	Gly	Ile	Pro	Thr
	210					215						220			
Gly	Val	Met	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser
225					230					235					240
Leu	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Arg	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Thr
				245					250					255	
Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn	Pro
			260					265						270	
Gly	Pro	Asp	Val	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ala	Ser
		275					280						285		
Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser

ES 2 702 087 T3

290						295						300					
Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu																	
305					310					315							320
Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe				325					330								335
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu				340				345									350
Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr				355				360									365
Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly				370				375									380
Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile																	385
385					390												400
Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe																	405
405																	410
Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser																	415
415																	420
Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser																	425
425																	430
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys																	435
435																	440
Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr																	445
445																	450
Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp																	455
455																	460
Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp																	465
465																	470
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr																	475
475																	480
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr																	485
485																	490
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys																	495
495																	500
500																	505
																	510

<210> 100

<211> 1536

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> precursor de la poliproteína de diacuerpo covalente (secuencia de ADN de SEQ ID NO. 99)

10

<400> 100

```

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggteect gaaactctcg 420
tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480
acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tctatcga 540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660
ggaataccta cagggtttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720
ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780
ctgctgaagc tggccggaga cgtggagagc aaccccgcc ccatggtcca gatgaccag 840
tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900
gagagcatta gcaagtattt agcctggat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960
cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020
tctggtacag atttcaactc caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080
tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa ctggagatc 1140
aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200
ttgcagccct cccagaccct cagtctgact gtgtcttct ctgggttttc actgaggact 1260
tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcagggg agggctctaga gtggctggca 1320

```

ES 2 702 087 T3

cacatttggg gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380
 tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440
 actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggg ttgcttactg gggccaaggg 1500
 actctgggtca ctgtgagctc actggggaggc tgctag 1536

5 <210> 101
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción de diacuerpo

<400> 101

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

15 <210> 102
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción de diacuerpo (secuencia de ADN de SEQ ID NO. 101)

<400> 102

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
 gatcagtcctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccacgc 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
 gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga 360

25

ES 2 702 087 T3

```

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaacc cgcctggttt 660
gcttactggg gccaaggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

```

5 <210> 103
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción de diacuerpo

<400> 103

```

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

```

15 <210> 104
 <211> 741
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción de diacuerpo (secuencia de ADN de SEQ ID NO. 103)

25 <400> 104

ES 2 702 087 T3

gacatcgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatgggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360
gttcagctgg tgcagtctgg agctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 420
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccacac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtatgctgat ccacgagcac agcctacatg 600
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgagag aaacggtgat 660
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaagggg ccacggtcac cgtctcctca 720
gttgagccca aatcttgta g 741

5 <210> 105
<211> 717
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH
<400> 105

gacatcgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatgggtg atagttttat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcctcagt gaagctgtcc 420
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480
ggacaaggcc ttgaatggat tggatgggtt gatccttcag acagtgaaac tcaactacaat 540
caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660
tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaate ttgtag 717

15 <210> 106
<211> 238
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH
<400> 106

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

ES 2 702 087 T3

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

<210> 107
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> CB3.1VL-h3G8VH

ES 2 702 087 T3

<400> 107

```

gatgttgta tgaccagac tccactcact ttgtcggta acattggaca accagcctcc      60
atctcttgta agtcaagtca ggcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg    120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactct atctgggtgtc taaactggac   180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc   240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg   300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc   360
caggttacc tgagagagtc tggcctgcyg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg   420
acttgtaact tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt   480
cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc   540
tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctcaa aaaccaggta   600
gtcctcacia tgaccaacat ggacctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata   660
aacccccgct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcatccaac   720
aggggagagt gttag                                                    735

```

5

<210> 108
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> CB3.IVL-h3G8VH

15

<400> 108

```

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

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

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

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

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

```

ES 2 702 087 T3

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
115 120 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
130 135 140

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
165 170 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
195 200 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn
225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys

<210> 109
<211> 704
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

<400> 109

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgccg cgctgggaga aagagtcagt 60
ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120
gatggaacta ttaaagcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtoccaaaa 180

ES 2 702 087 T3

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240
 gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa aggagggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360
 cagcctgggg ctgagctggg gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420
 ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480
 gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatggttcaag 540
 gaaagggcac attgactggt gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc 600
 tgacatctga ggactctgcg gtctattact gtgcaagagc tatgggctac tgggggtcaag 660
 gaacctcagt caccgtctcc tcagttgagc ccaaattcttg ttag 704

<210> 110
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> 8B5-CB3.1-VEPKSC

10

<400> 110

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ser	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Lys	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Glu	Ser	Gly	Ser	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			100					105						110	
Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg
		115					120					125			

ES 2 702 087 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 210 215 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 111
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> CB3.1-8B5-FNRGEC

<400> 111

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta acattggaca accagcctcc 60
 atctcttgta agtcaagtca ggcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactc atctgggtgc taaactggac 180
 tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagggg cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggccggaggc 360
 gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420
 tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480
 ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540
 tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600
 gtctacctgc aatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660
 ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcggt caacagggga 720
 gagtgtag 729

5

10

15

ES 2 702 087 T3

<210> 112
 <211> 242
 <212> PRT
 5 <213> artificial

<220>
 <223> CB3.1-8B5-FNRGEC

10 <400> 112

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
 130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
 145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
 165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

ES 2 702 087 T3

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly
 225 230 235 240

Glu Cys

5 <210> 113
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC
 <400> 113

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60
 ctcaactgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120
 gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180
 aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240
 gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360
 cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420
 ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480
 gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatggttcaag 540
 gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600
 ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctgggggtcaa 660
 ggaacctcag tcaccgtctc ctcaactggga ggctgctag 699

15 <210> 114
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC
 <400> 114

25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly

ES 2 702 087 T3

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

5 <400> 115
gatggttgta tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60
atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420
tcttggaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600
gtctacctgc aaatgaacag ctaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgt gggaggctgc 720
tag 723

10 <210> 116
<211> 240
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 116
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Asn Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

20

ES 2 702 087 T3

5 <210> 119
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador Lgh630R

 10 <400> 119
 gcctccgcct ccggatccgc ctccttcag ctccagctg gtccc 45

 15 <210> 120
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Cebador Lgh631F

 <400> 120
 ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

 25 <210> 121
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> artificial

 30 <220>
 <223> Cebador Lgh640R

 <400> 121
 ttgaattct aacctctcc cctgtgaac gaggagactg tgagagtgg 49

 35 <210> 122
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial

 40 <220>
 <223> Cebador Lgh644R

 45 <400> 122
 ttgtcgtca tcacgtctt ttagtcgga gtggacacct gtggagag 48

 50 <210> 123
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador Lgh646R

 55 <400> 123
 ttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

 60 <210> 124
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador Lgh647F

 65 <400> 124
 caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

ES 2 702 087 T3

<210> 125
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador Lgh648R
 10 <400> 125
 ttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43
 <210> 126
 <211> 1047
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> 2.4G2-3G8-hKappa
 20 <400> 126
 gatgtccaga tgaccagtc tccatctaata ctgtctgct ctcttgaga aagtgttcc 60
 atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag cctggtatct acagaaacct 120
 gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat ggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagatc ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240
 gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300
 gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa 360
 gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct 420
 gggttttcac tgaggacttc tggtagggg gtaggctgga ttcgtagcc ttcagggag 480
 ggtctagagt ggctggcaca ctttgggtg gatgatgaca agcgtataa tccagccctg 540
 aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600
 agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660
 gcttactggg gccaaaggac tctggctact gtgagctcac tgggaggctg cggcggaggg 720
 agccgtacgg tggctgcacc atcggctctc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa 780
 tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 840
 cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 900
 gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 960
 gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 1020
 aagagcttca acaggggaga gtgttag 1047
 25
 <210> 127
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> 2.4G2-3G8-hKappa

ES 2 702 087 T3

<400> 127

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

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met
 35 40 45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 115 120 125

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 130 135 140

Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

ES 2 702 087 T3

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360
 gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420
 tgtgcagcct caggattcac ttccagtgcac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480
 acgacgggtc tggagtgggt cgcattccatt agttatgatg gtggtgacac tcaactatcg 540
 gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600
 caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660
 ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720
 ctgggaggct gcggcgagg gagegcctcc accaagggcc catcggctctt ccccctggca 780
 ccctcctcca agagcaactc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 840
 ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900
 ttcccggctg tectacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 960
 tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 1020
 aaggtggaca agagagttga gcccaaactc tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc 1080
 ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 1140
 accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa 1200
 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1260
 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1320
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1380
 gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1440
 accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500
 aaaggcttct atcccagcga catcgcctg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1560
 aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1620
 ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1680
 gaggtctctc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1737

<210> 129
 <211> 578
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 3G8-2.4G2-hGI

5

ES 2 702 087 T3

<400> 129

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
180 185 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
210 215 220

ES 2 702 087 T3

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 260 265 270

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 290 295 300

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 325 330 335

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 340 345 350

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 355 360 365

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 370 375 380

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 385 390 395 400

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 405 410 415

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 420 425 430

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 435 440 445

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 450 455 460

ES 2 702 087 T3

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
465 470 475 480

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
485 490 495

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
500 505 510

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
515 520 525

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
530 535 540

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
545 550 555 560

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
565 570 575

Gly Lys

<210> 130
<211> 723
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> CD79VL-CD32BVH

<400> 130

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300
ctcacgttcg gcggaggggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420
tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

ES 2 702 087 T3

gtctacctgc aatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660
 ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctctcgt gggaggctgc 720
 tag 723

<210> 131
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> CD7 9-CD32BVH

<400> 131

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
 165 170 175

ES 2 702 087 T3

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
 225 230 235 240

5 <210> 132
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> CD32BVL-CD7 9VH-1

<400> 132

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120
 ggcaaggccc ctgacgcct gatctacgcc gcattcactt tagattctgg tgtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240
 gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg 300
 gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360
 cagtctggag ctgagtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420
 ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480
 gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540
 gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600
 ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660
 gggaccacgg tcaccgtctc ctcaactggga ggctgctga 699

15 <210> 133
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> CD32BVL-CD7 9VH-1

<400> 133

ES 2 702 087 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
 225 230

<210> 134
 <211> 703
 <212> ADN

ES 2 702 087 T3

<213> artificial

<220>

<223> CD32BVL-CD7 9VH-2

5

<400> 134

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc      60
atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca      120
ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc      180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct      240
gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcggaggg      300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgya tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg      360
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct      420
ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggccctggg acaagggctt      480
gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag      540
gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc      600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa      660
gggaccacgg tcaccgtctc ctcaactggga ggctgctgaa ttc                          703
    
```

10

<210> 135

<211> 232

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> CD32BVL-CD7 9VH-2

<400> 135

```

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

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

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

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

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

20

ES 2 702 087 T3

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de diacuerpo que comprende una primera, segunda, tercera y cuarta cadena polipeptídica, en la que:

5 (A) dicha primera cadena polipeptídica comprende en el extremo N-terminal en sentido hacia el extremo C-terminal:

- 10 (i) un dominio (A) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica de un epítipo (1);
 (ii) un dominio (B) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica de un epítipo (2); y
 (iii) un dominio (C) que comprende un dominio de región constante de cadena ligera (CL);

15 en la que dichos dominios (A) y (B) están enlazados covalentemente entre sí por un enlazador peptídico de 1-9 restos de aminoácido, de modo que dichos dominios (A) y (B) no se asocian para formar un sitio de unión al epítipo;

(B) dicha segunda cadena polipeptídica comprende en el extremo N-terminal en sentido hacia el extremo C-terminal:

- 20 (i) un dominio (D) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una segunda inmunoglobulina (VL2) específica de dicho epítipo (2);
 (ii) un dominio (E) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) específica de dicho epítipo (1);
 25 (iii) un dominio (F) que comprende un dominio de región constante de cadena pesada 1 (CH1), una región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3);

30 en la que dichos dominios (D) y (E) están enlazados covalentemente entre sí por un enlazador peptídico de 1-9 restos de aminoácido, de modo que dichos dominios (D) y (E) no se asocian para formar un sitio de unión al epítipo;

35 en la que dichos dominios (A) y (E) se asocian formando un sitio de unión que se une dicho epítipo (1); dichos dominios (B) y (D) se asocian formando un sitio de unión que se une dicho epítipo (2); y dichos dominios (C) y (F) están enlazados covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro;

(C) dicha tercera cadena polipeptídica comprende en el extremo N-terminal en sentido hacia el extremo C-terminal:

- 40 (i) un dominio (G) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica de un epítipo (3);
 (ii) un dominio (H) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica de un epítipo (4); y
 45 (iii) un dominio (I) que comprende un dominio de región constante de cadena ligera (CL); en la que dichos dominios (G) y (H) están enlazados covalentemente entre sí por un enlazador peptídico de 1-9 restos de aminoácido, de modo que dichos dominios (G) y (F) no se asocian para formar un sitio de unión al epítipo;

(D) dicha cuarta cadena polipeptídica comprende en el extremo N-terminal en sentido hacia el extremo C-terminal:

- 50 (i) un dominio (J) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una cuarta inmunoglobulina (VL4) específica de dicho epítipo (4);
 (ii) un dominio (K) que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) específica de dicho epítipo (3);
 55 (iii) un dominio (L) que comprende un dominio de región constante de cadena pesada 1 (CH1), una región bisagra, una región constante de cadena pesada 2 (CH2) y una región constante de cadena pesada 3 (CH3);

60 en la que dichos dominios (J) y (K) están enlazados covalentemente entre sí por un enlazador peptídico de 1-9 restos de aminoácido, de modo que dichos dominios (J) y (K) no se asocian para formar un sitio de unión al epítipo;

65 en la que dichos dominios (G) y (K) se asocian formando un sitio de unión que une dicho epítipo (3); dichos dominios (H) y (J) se asocian formando un sitio de unión que une dicho epítipo (4); dichos dominios (I) y (L) están enlazados covalentemente entre sí a través de un enlace disulfuro; y dicha región constante de cadena pesada 2 (CH2) y dicha región constante de cadena pesada 3 (CH3) de dichas

segunda y cuarta cadena polipeptídica se asocian para formar una región Fc.

- 5 2. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dichos epítomos (1) y (3) se presentan ambos sobre la misma molécula de antígeno.
3. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dichos epítomos (1) y (3) son idénticos.
- 10 4. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dichos epítomos (2) y (4) se presentan ambos sobre la misma molécula de antígeno.
5. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dichos epítomos (2) y (4) son idénticos.
- 15 6. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que al menos un epítomo es un epítomo de: un antígeno de un patógeno, un antígeno autoinmunitario, una toxina o un fármaco.
7. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que al menos un epítomo es CD32B y al menos un epítomo es CD16A.
- 20 8. Las moléculas de ácido nucleico que codifican dicha primera, segunda, tercera y cuarta cadena polipeptídica de la reivindicación 1.
9. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1 para su uso en terapia.
- 25 10. La molécula de diacuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el diacuerpo se usa en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno caracterizado por un antígeno patógeno, molécula de diacuerpo que posee un sitio de unión al epítomo que se une a dicho antígeno patógeno.

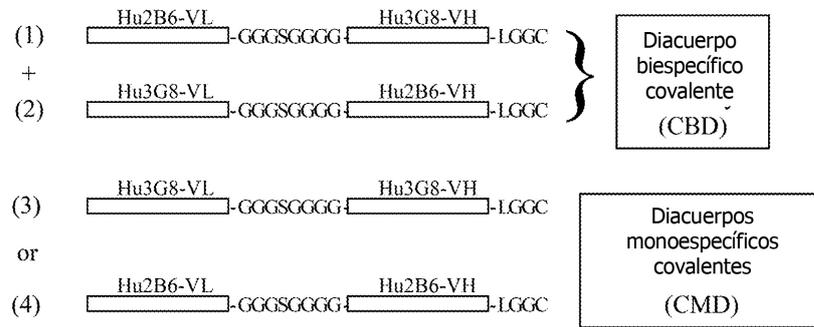


FIG. 2

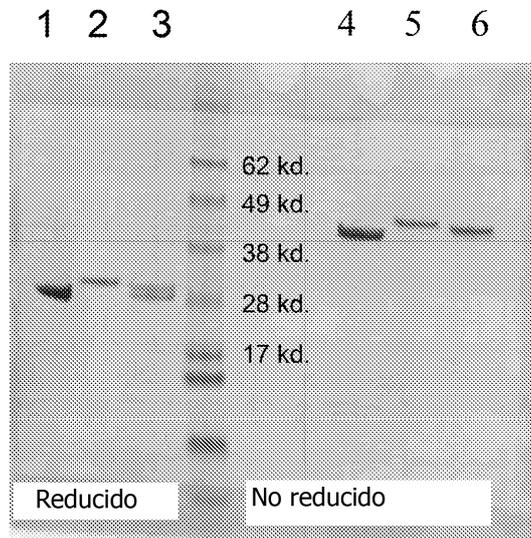


FIG. 3

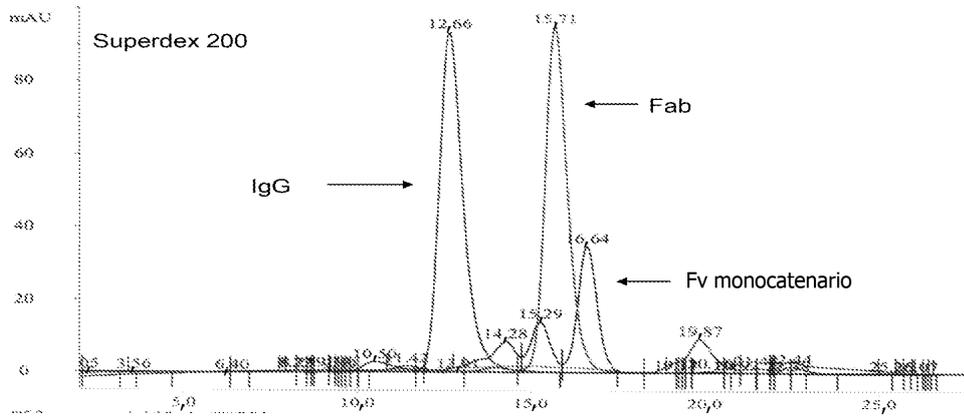


FIG. 4A

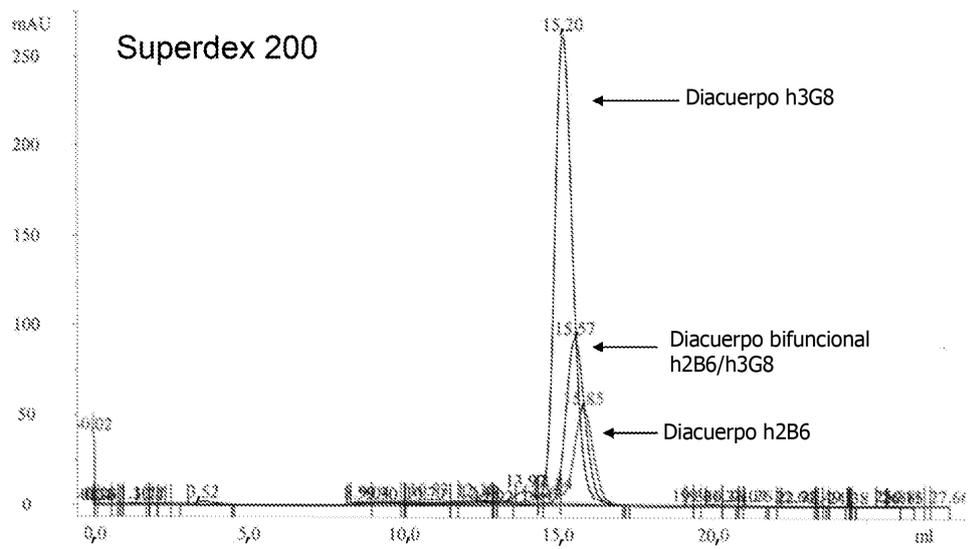


FIG. 4B

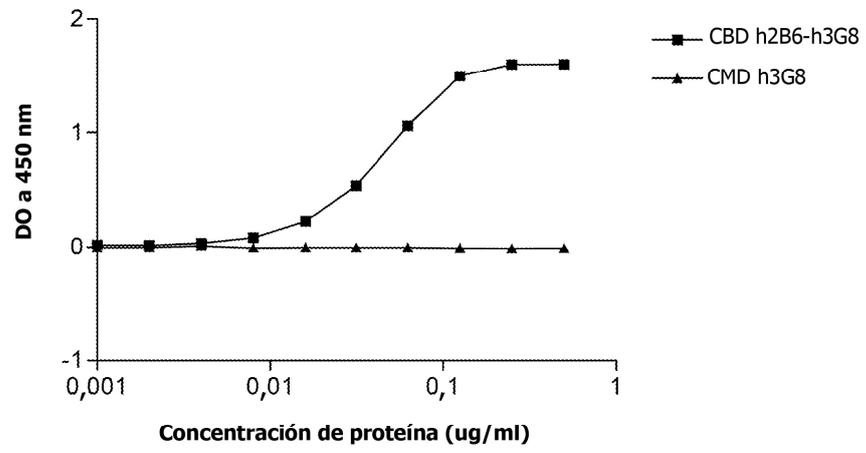


FIG. 5

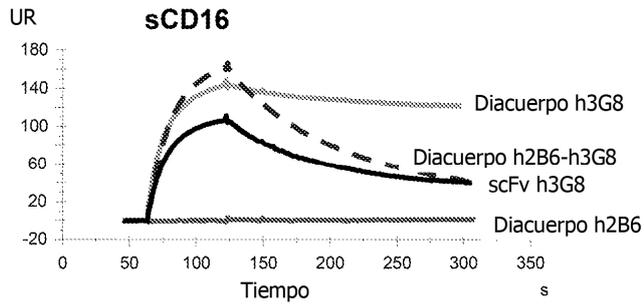


FIG. 6A

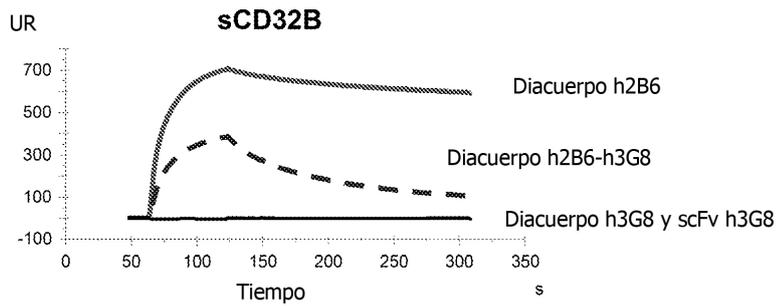


FIG. 6B

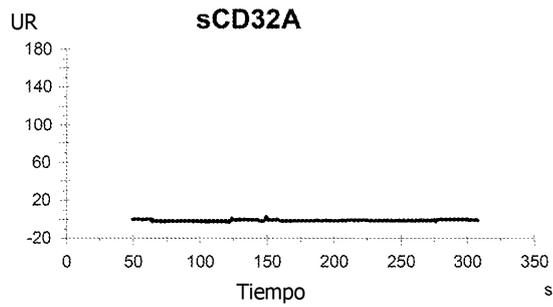


FIG. 6C

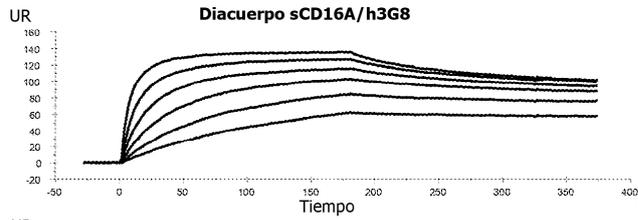


FIG. 7A

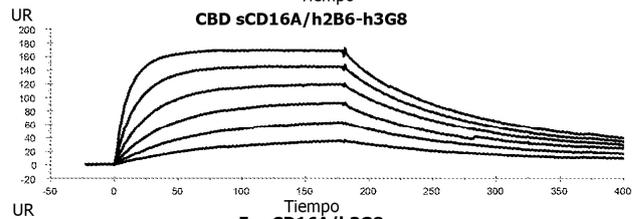


FIG. 7B

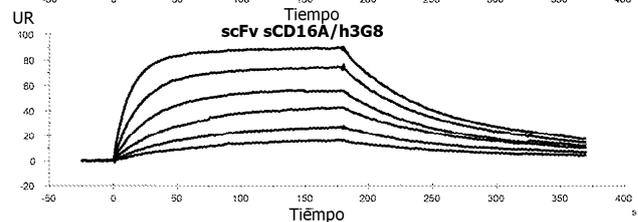


FIG. 7C

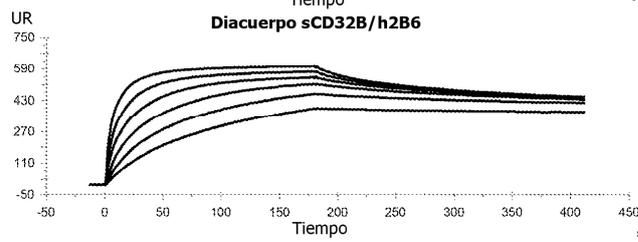


FIG. 7D

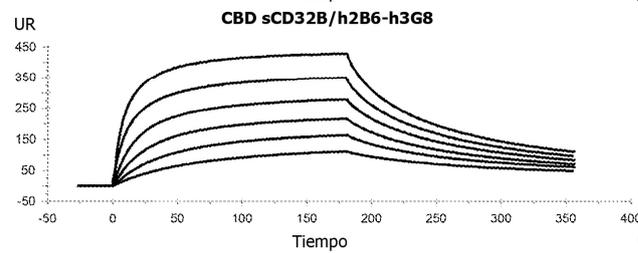


FIG. 7E

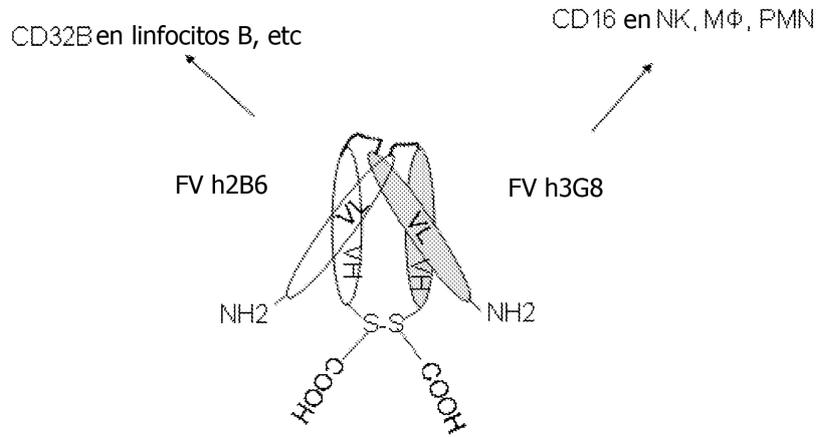


FIG. 8

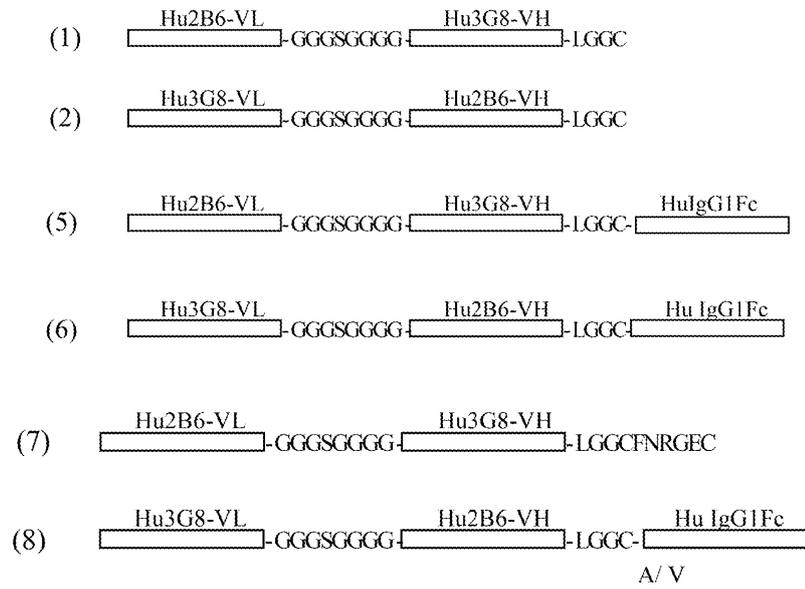


FIG. 9

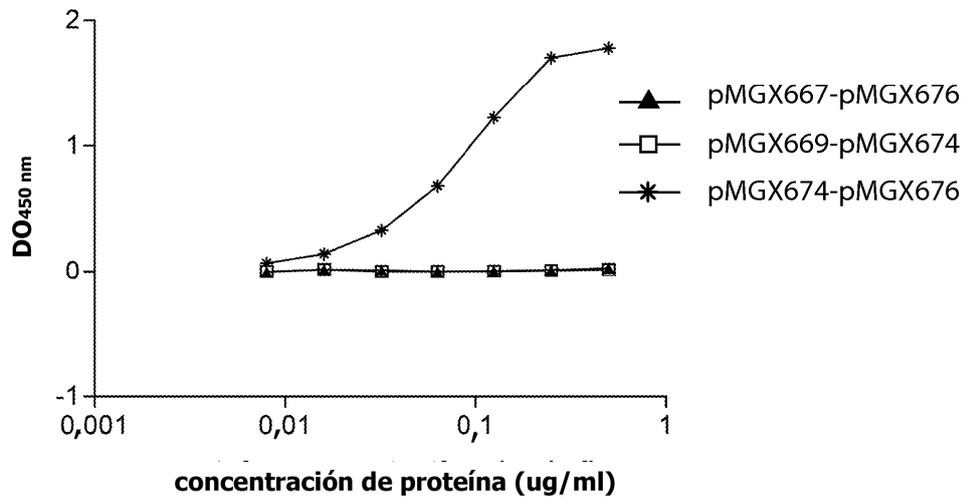


FIG. 10

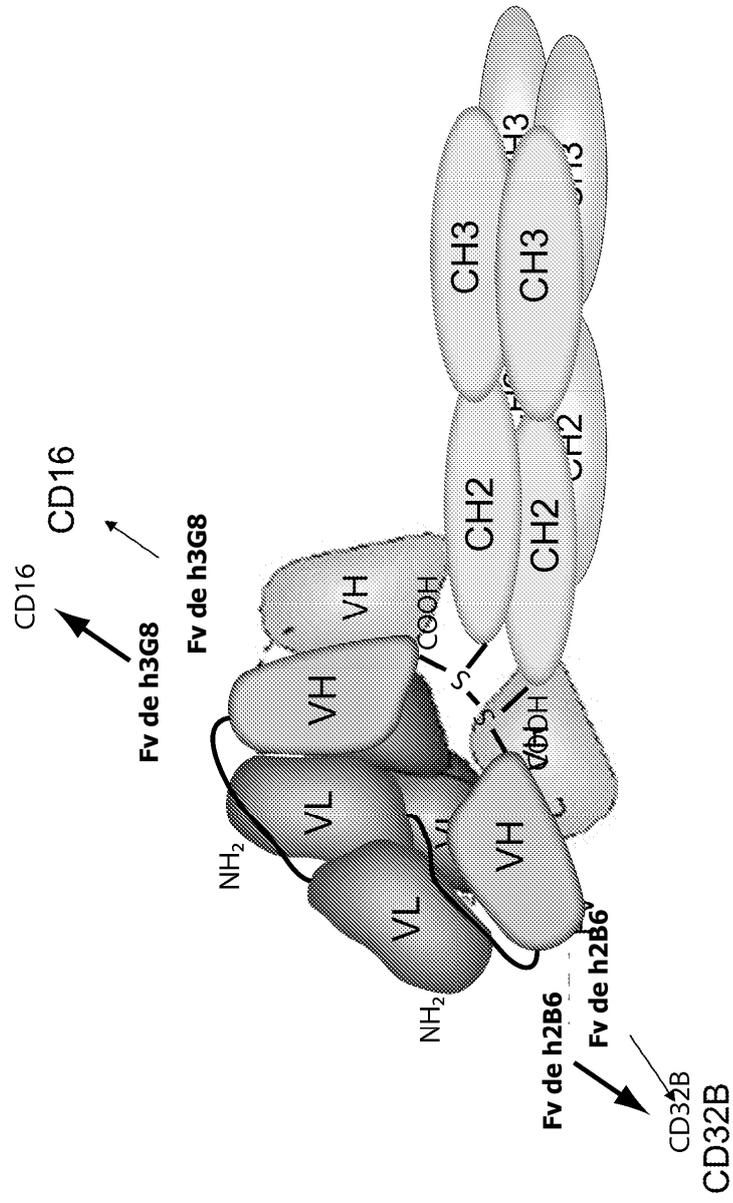


FIG. 11 **FIG. 11**

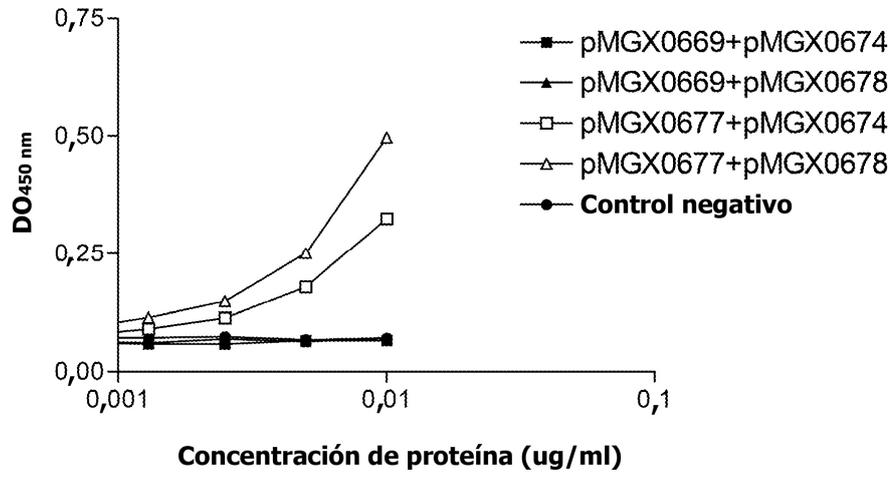


FIG. 12

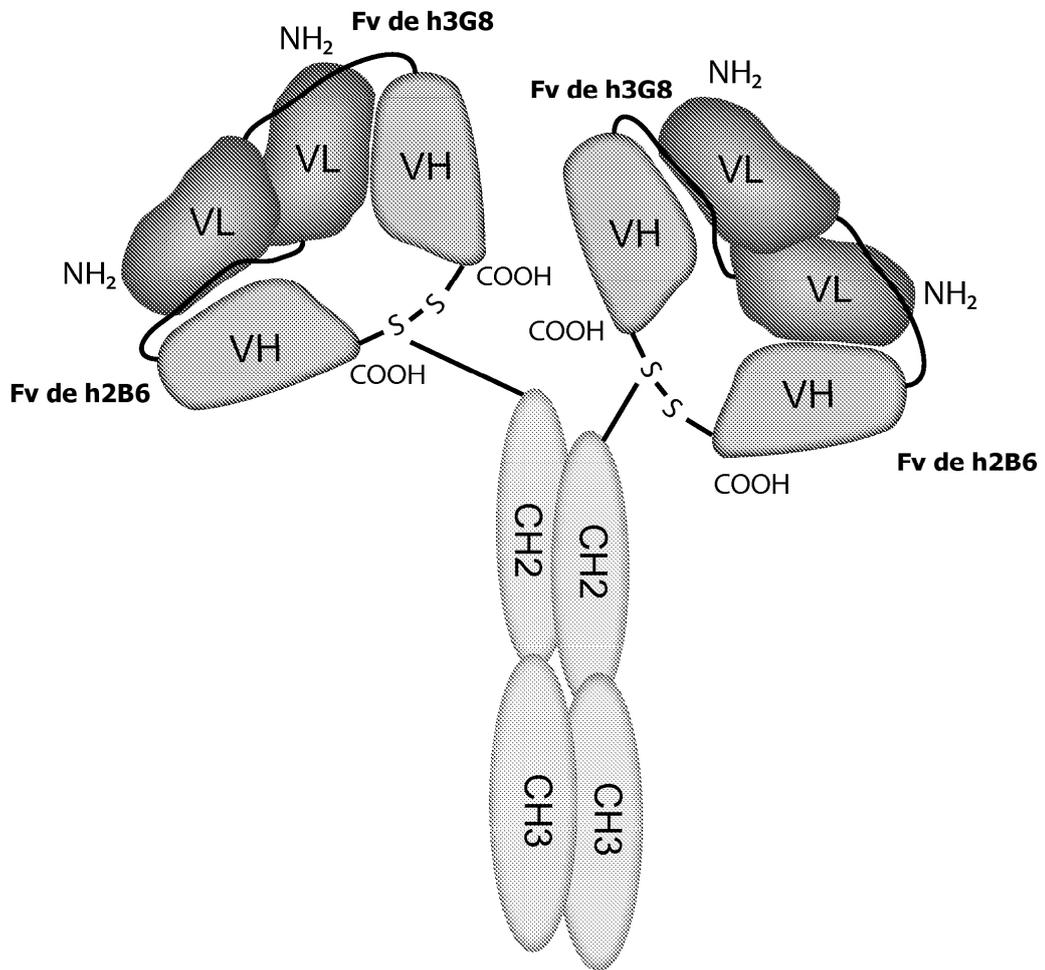


FIG. 13

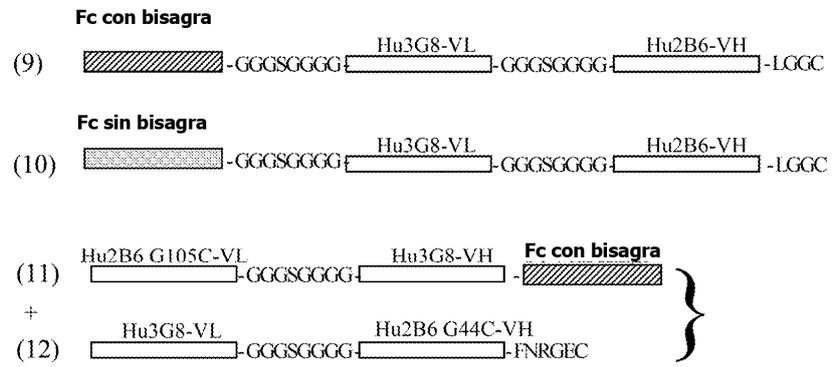


FIG. 14

M 1 2 3

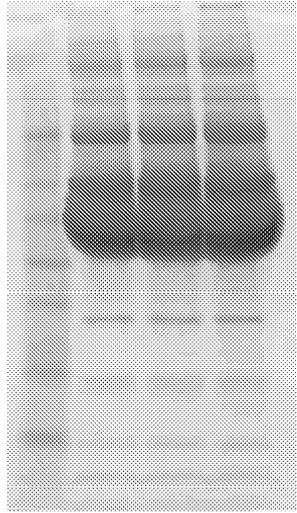


FIG. 15A

3 2 1 M

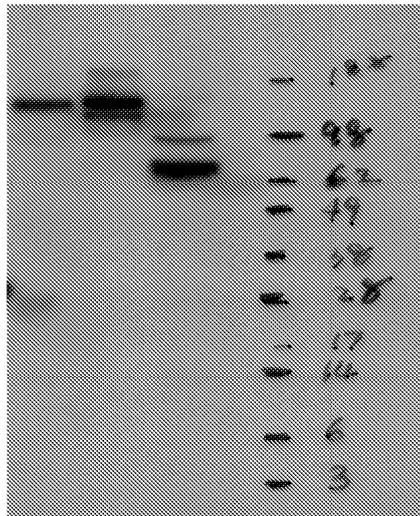


FIG. 15B

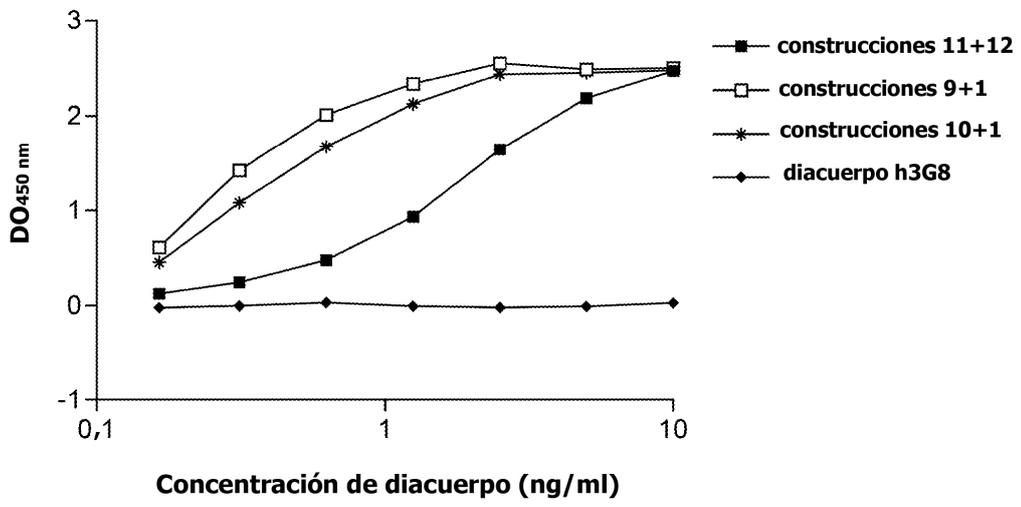
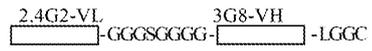


FIG. 16



+



**Diacuerpo
biespecifico
covalente
(CBD)**

FIG. 17

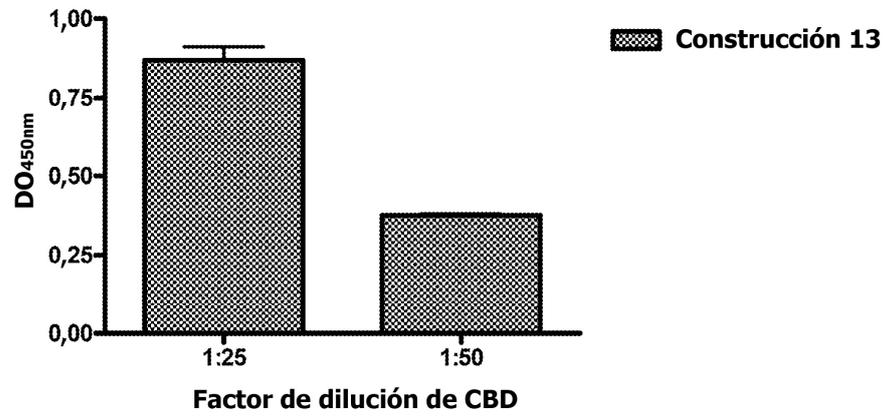


FIG. 18

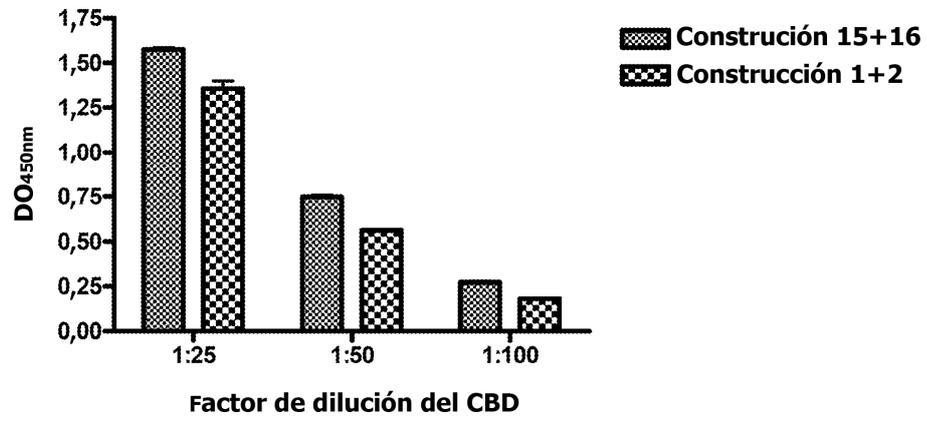


FIG. 19

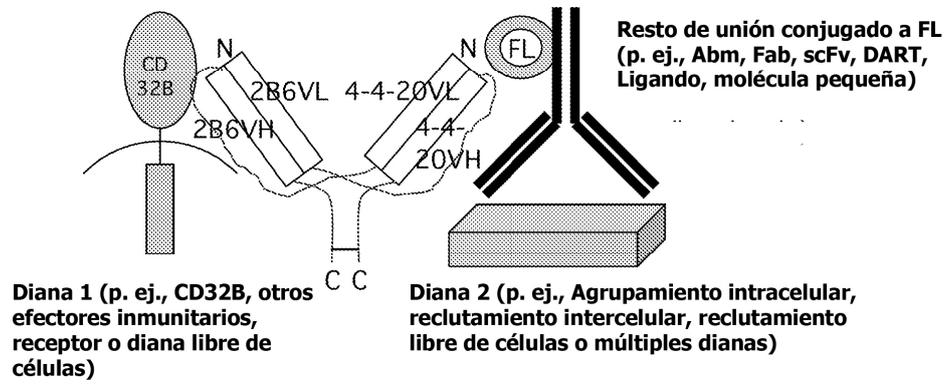


FIG. 20

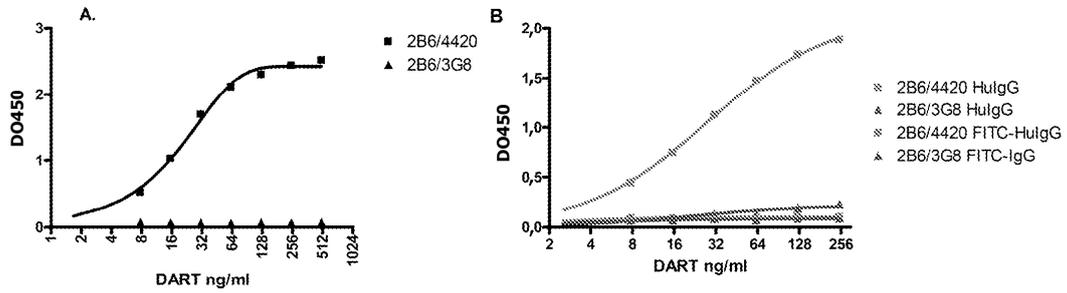


FIG. 21

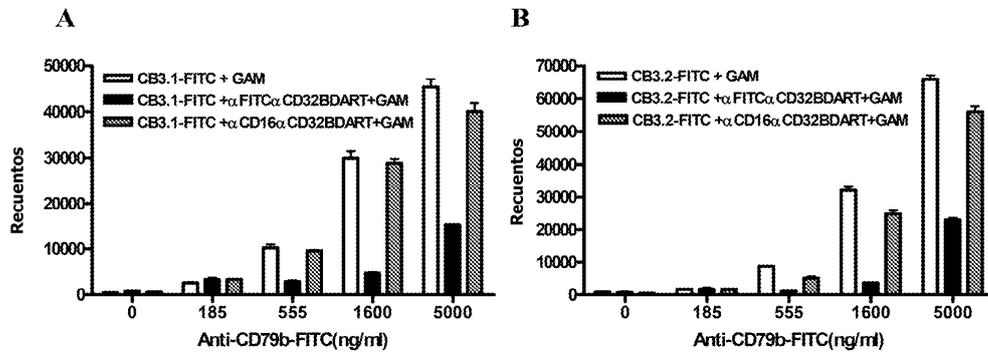


FIG. 22

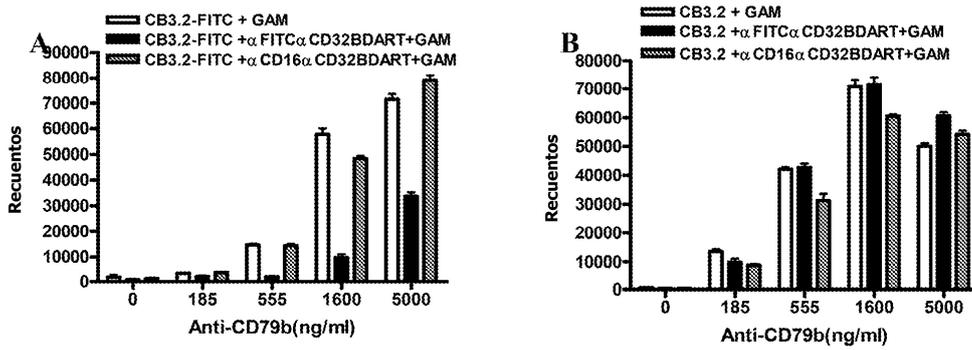


FIG. 23

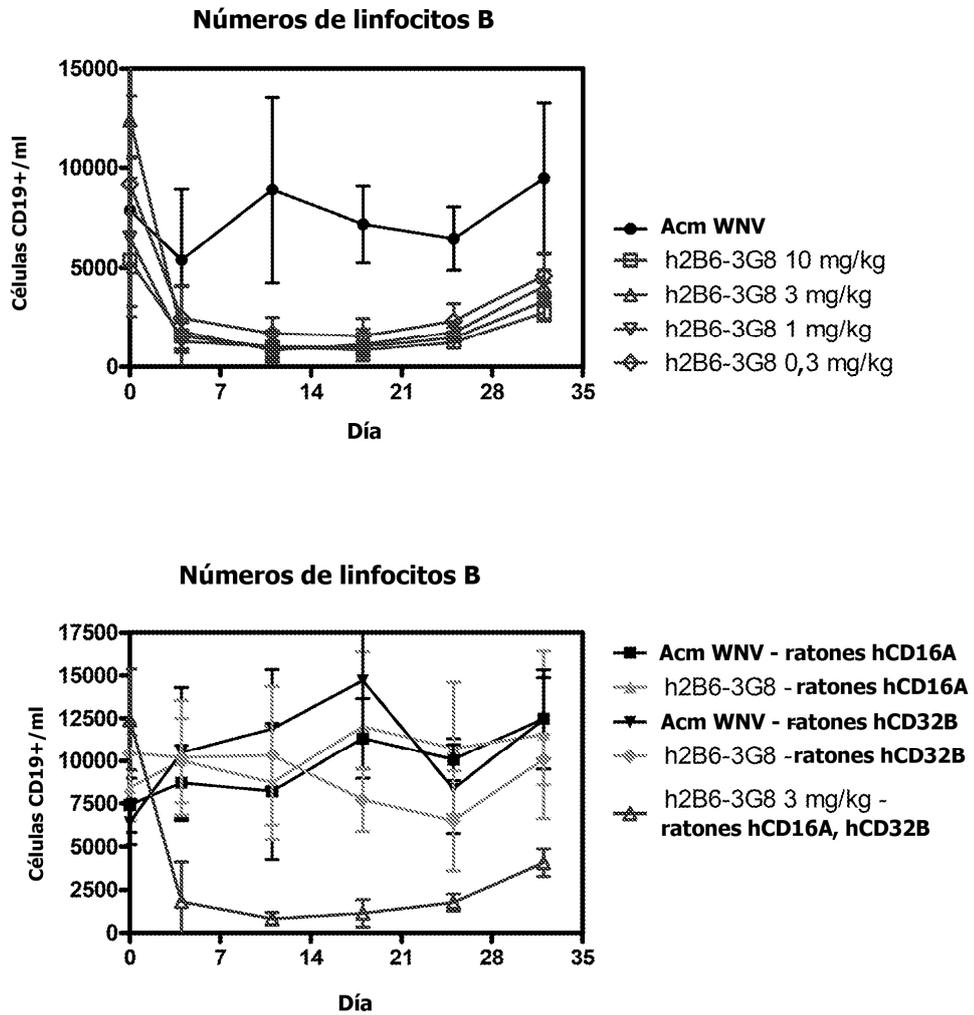


FIG. 24

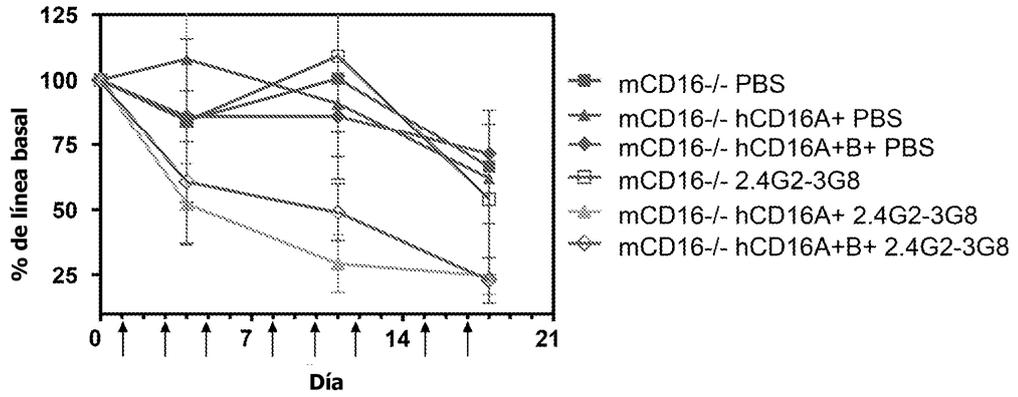


FIG. 25

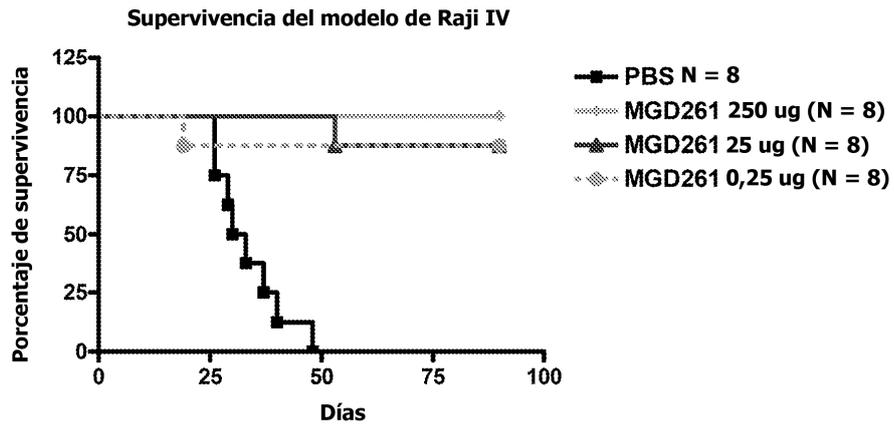


FIG. 26

**3G8.3G8 DART expresado en E. coli
(SDS-PAGE, SEC)**

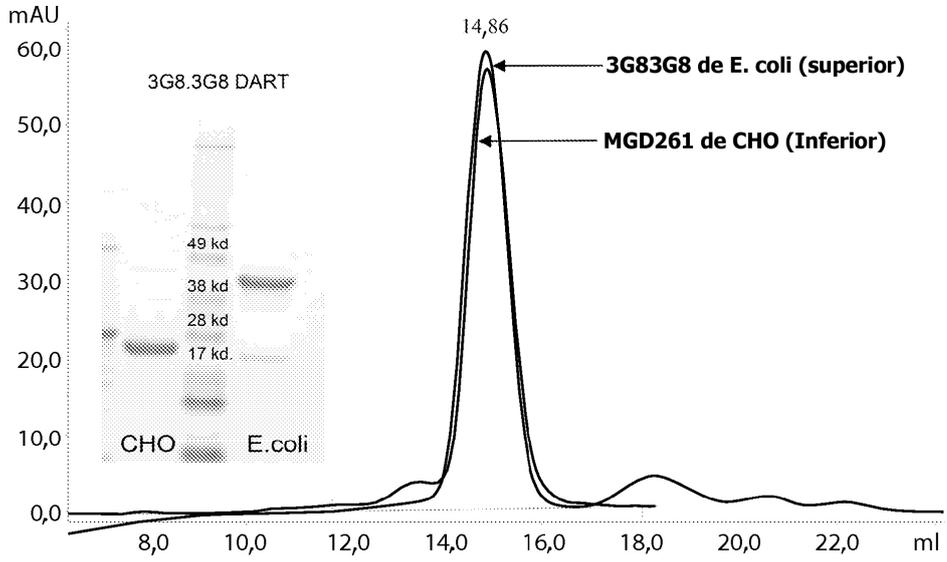


FIG. 27

Elisa de unión a CD16-DART

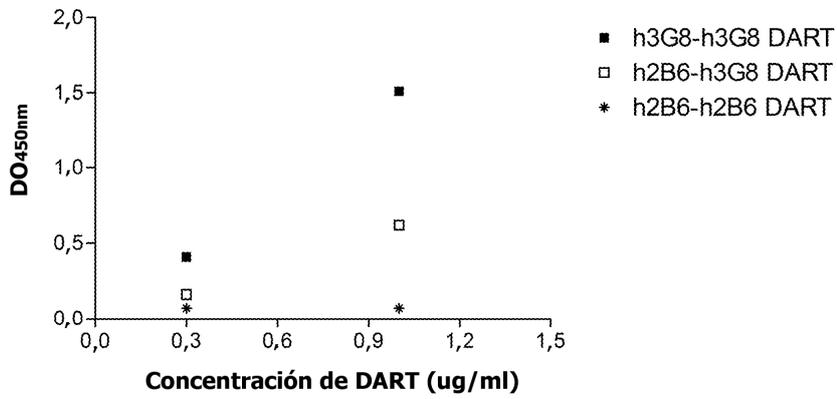


FIG. 28

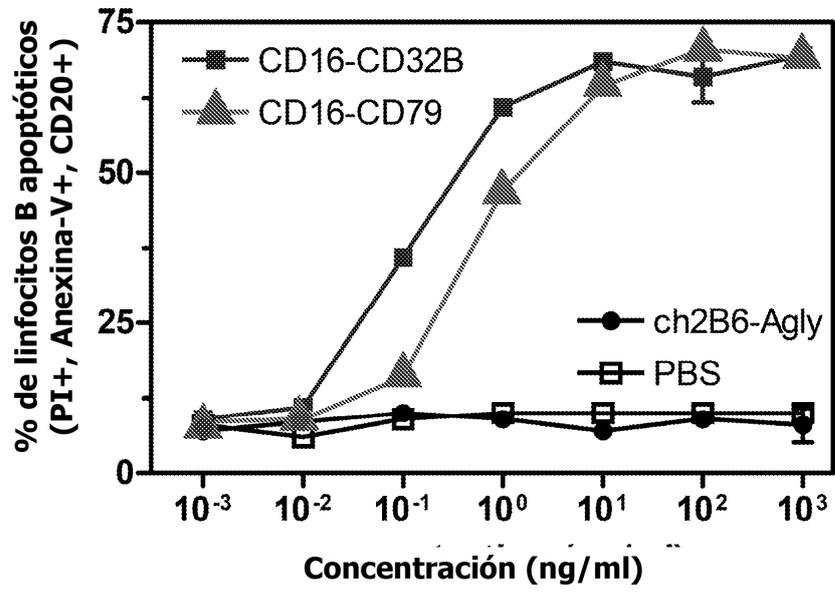


FIG. 29

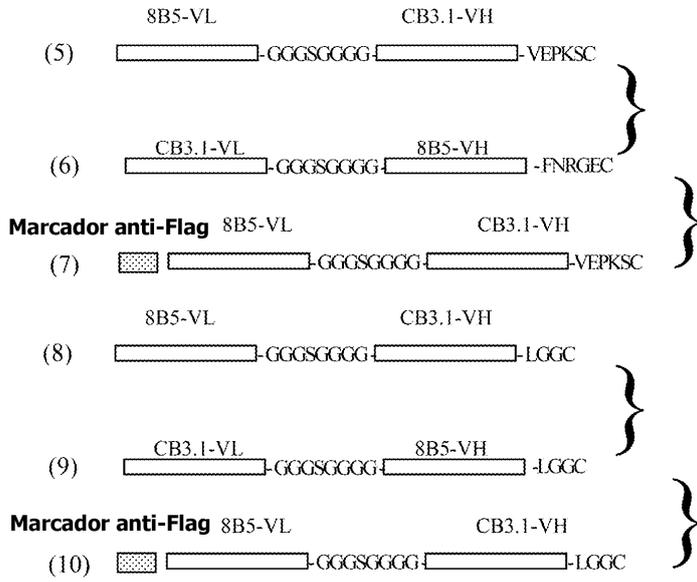


FIG. 30

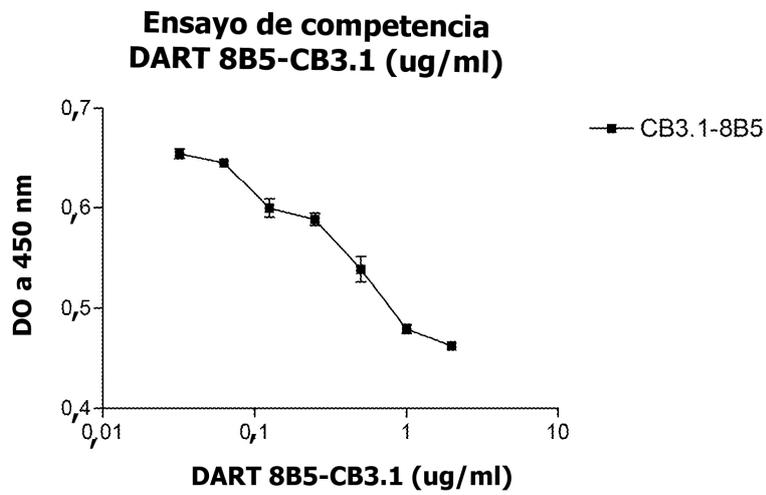


FIG. 31

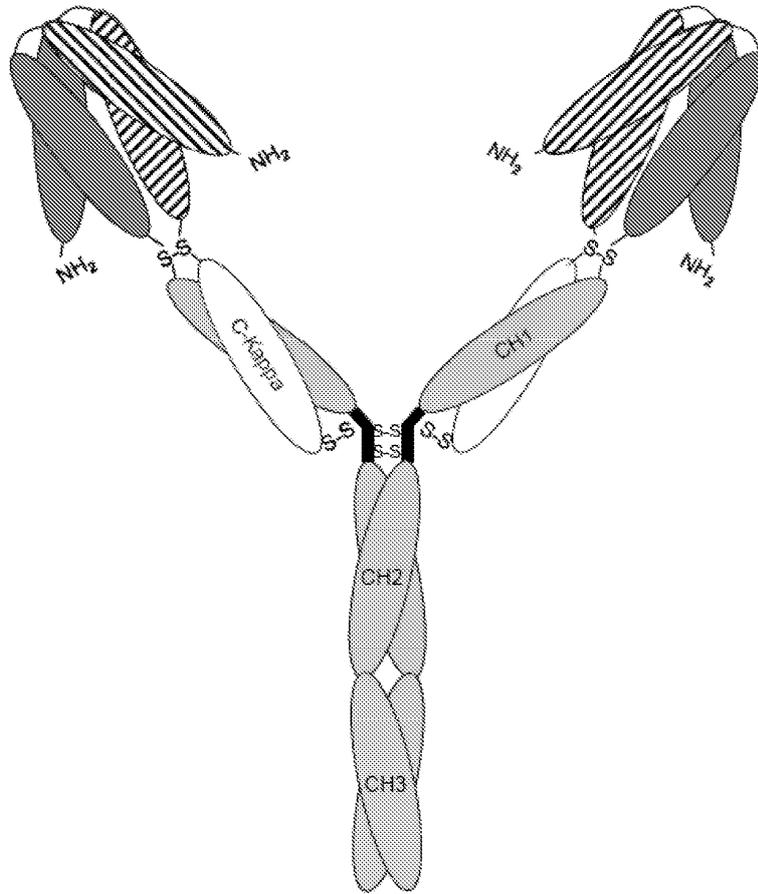
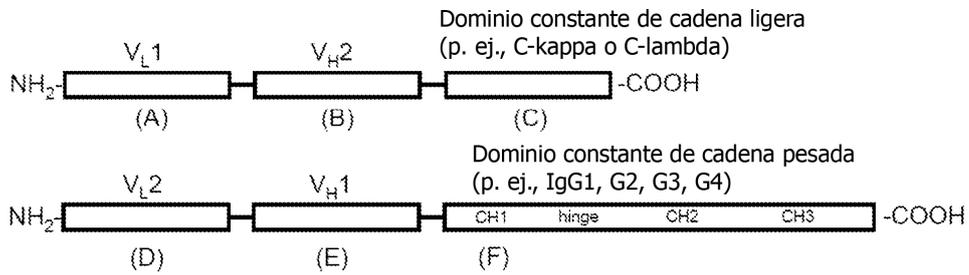


FIG. 32

DART tetravalente de tipo Ig



(A) + (E) = sitio de unión al epítipo 1
 (D) + (B) = sitio de unión al epítipo 2
 (C) + (F) = C-kappa/lambda + CH₁ (asociación similar a una Ig tradicional)
 bisagra-CH₂-CH₃ se asociará formando un Fc

FIG. 33

ELISA de unión a mCD32-hCD16A

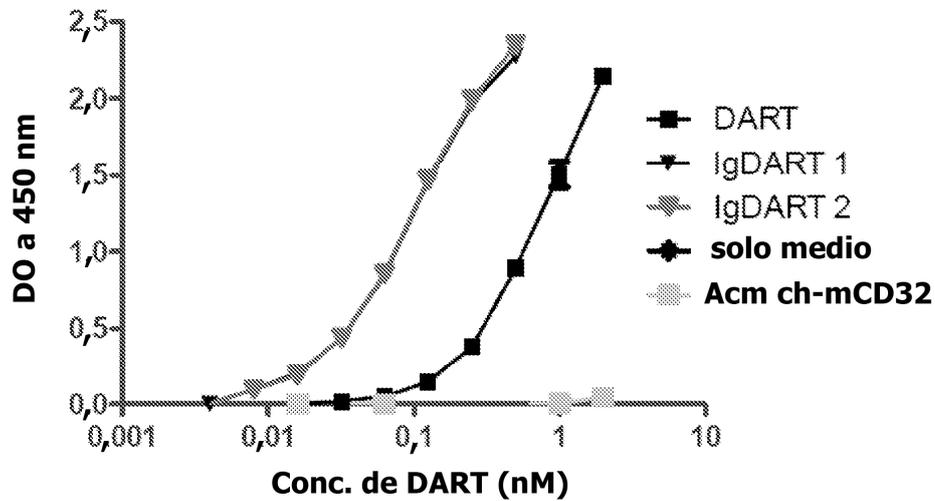


FIG. 34

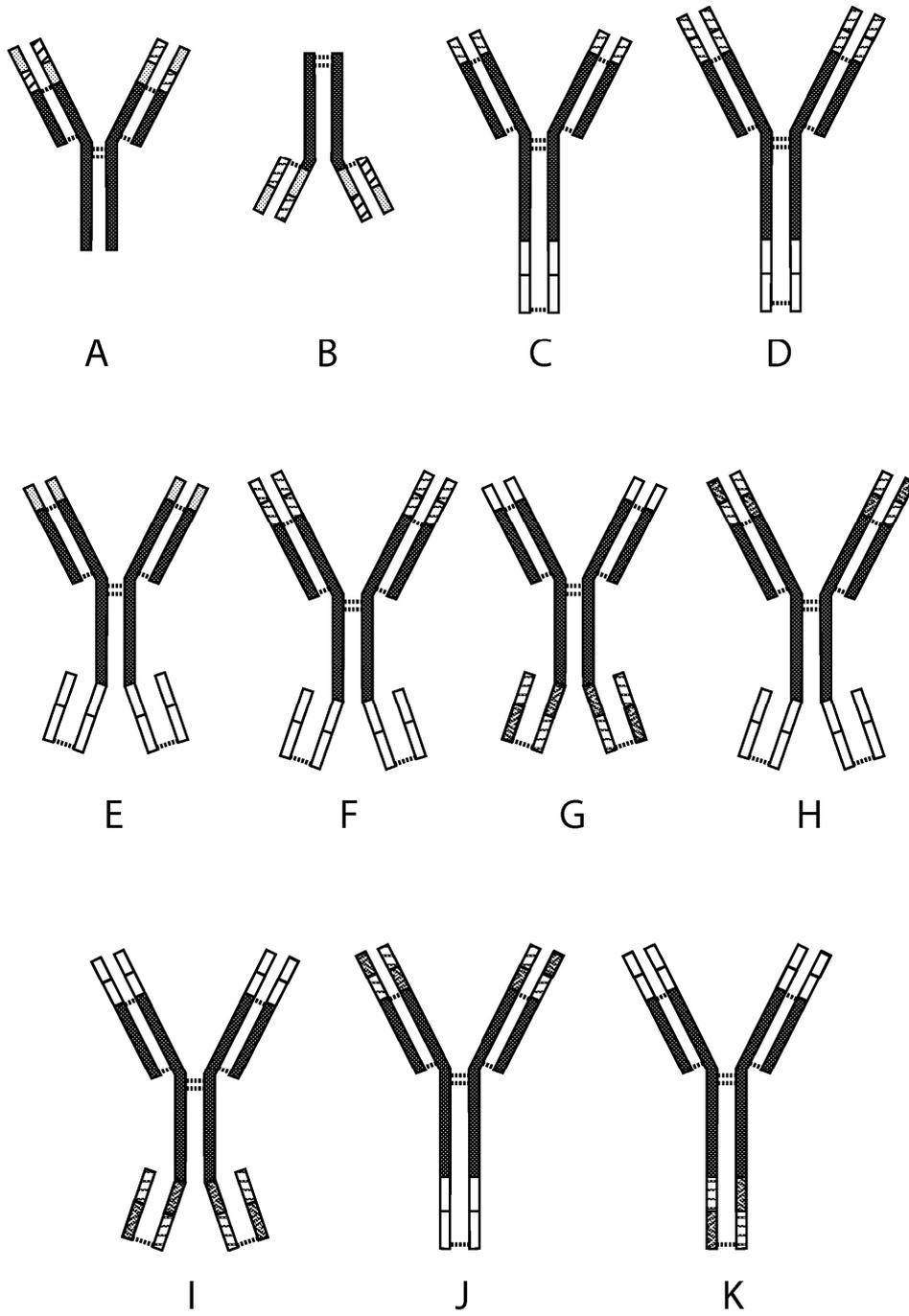


FIG. 35