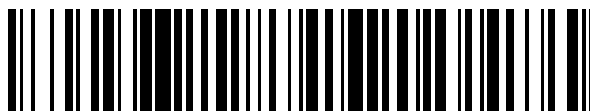


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 152**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12P 21/04** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2006 PCT/US2006/014481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2006 WO06113665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2006 E 06750508 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 1868650**

54 Título: **Diacuerpos covalentes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**15.04.2005 US 671657 P**

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

**02.04.2019**

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**

ES 2 707 152 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 usos de los mismos

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. n° 60/671.657 presentada el 15 de abril de 2005.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a moléculas de diacuerpos y a los usos de las mismas en el tratamiento de una enfermedad infecciosa y de cánceres. Las moléculas de diacuerpos de la invención comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión del epítipo, que pueden reconocer el mismo o diferentes epítipos. Adicionalmente, los epítipos pueden ser de la misma o de diferentes moléculas, o estar ubicados en la misma o en diferentes células. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula del  
15 diacuerpo pueden estar unidas covalentemente a través de enlaces covalentes no peptídicos, tales como, pero no se limitan a, un puente de disulfuro de los residuos de cisteína ubicados en cada cadena polipeptídica. En algunas realizaciones en particular, las moléculas de diacuerpos de la presente invención comprenden adicionalmente una región Fc, que permite el diseño de una funcionalidad de tipo anticuerpo en la molécula.

**Antecedentes de la invención**

El diseño de diacuerpos covalentes se basa en la construcción de un Fv de cadena única (scFv) (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6444-6448). En una IgG intacta, sin modificar, los dominios VL y VH están  
25 ubicados en cadenas polipeptídicas individuales, es decir, en la cadena ligera y en la cadena pesada, respectivamente. La interacción de la cadena ligera de un anticuerpo y de la cadena pesada de un anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH, forma uno de los sitios de unión del epítipo del anticuerpo. Por el contrario, la construcción scFv comprende un dominio VL y uno VH de un anticuerpo contenidos en una única cadena polipeptídica en la que los dominios están separados por un conector flexible con una longitud suficiente para permitir el autoensamblaje de los dos dominios en un sitio funcional de unión del epítipo. Cuando el  
30 autoensamblaje del es imposible debido a que el conector tiene una longitud insuficiente (menor de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos), dos de las construcciones del scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, asociándose el VL de una cadena con el VH de la otra (revisado en Marvin et al., 2005, Acta Pharmacol. Sin. 26: 649-658). Además, se ha demostrado que la adición de un residuo de cisteína en el c terminal de la construcción permite la formación de un puente de disulfuro en las cadenas polipeptídicas, lo que estabiliza el  
35 dímero resultante sin interferir en las características de unión de la molécula bivalente (véase, por ejemplo, Olafsen et al., 2004, Prot. Engr. Des. Sel. 17: 21-27). Además, cuando se seleccionan unos dominios VL y VH con una especificidad diferente, puede construirse no sólo una molécula bivalente, sino también una biespecífica. Los diacuerpos bivalentes tienen un amplio abanico de aplicaciones que incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y la modificación del diacuerpo en diversas aplicaciones, proporcionando una avidéz mejorada por los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y un  
40 direccionamiento dirigido a unos tipos celulares específicos que se basa en la presencia de ambos antígenos objetivo. Debido al aumento en su valencia, a los bajos índices de disociación y al rápido aclaramiento de la circulación (para los diacuerpos de pequeño tamaño, a o por debajo de ~ 50 kDa), las moléculas de diacuerpos conocidas en la materia también han mostrado un uso en particular en el campo de la obtención de imágenes de tumores (Fitzgerald et al., 1997, Protein Eng. 10: 1221). Es de particular importancia la reticulación de las diferentes  
45 células, por ejemplo, la reticulación de los linfocitos T citotóxicos con las células tumorales (Staerz et al., 1985, Nature 314: 628-631 y Holliger et al., 1996, Protein Eng. 9: 299-305). Los dominios de unión al epítipo del diacuerpo también pueden ser dirigidos a un determinante de la superficie de cualquier célula efectora inmunitaria tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que son expresados en los linfocitos T, en los linfocitos citolíticos naturales (células NK) o en otras células mononucleares. En muchos estudios, también se averiguó que la unión del diacuerpo a los determinantes de la célula efectora, por ejemplo, a los receptores Fcγ (FcγR), activa la célula efectora (Holliger et al., 1996, Protein Eng. 9: 299-305; Holliger et al., 1999, Cancer Res. 59: 2909-2916). Normalmente, la activación de la célula efectora es desencadenada por la unión de un anticuerpo unido a un antígeno a una célula efectora a través de la interacción Fc-FcγR; por lo tanto, a este respecto, las moléculas de diacuerpos de la invención pueden  
50 mostrar una funcionalidad de tipo Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (por ejemplo, según se ensaya en cualquier ensayo de función efectora conocido en la materia o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, el ensayo de ADCC)). Mediante la reticulación de las células tumorales y de las células efectoras, el diacuerpo no sólo lleva la célula efectora a las proximidades de las células tumorales, sino que da lugar a una destrucción efectiva del tumor (véase, por ejemplo, Cao y Lam, 2003, Adv. Drug. Deliv. Rev. 55: 171-197).

60

**Receptores de las células efectoras y sus papeles en el sistema inmunitario**

En la fracción inmunitaria tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con las células del sistema  
65 inmunitario da como resultado un amplio abanico de respuestas, que varían desde funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpo, la desgranulación de los mastocitos y la fagocitosis, hasta señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de los linfocitos y de la secreción de anticuerpos.

Todas estas interacciones son iniciadas a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos o de los complejos inmunitarios a los receptores especializados en la superficie celular de las células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por los anticuerpos y los complejos sin unitarios es el resultado de la heterogeneidad estructural de los receptores Fc. Los receptores Fc comparten unos dominios de unión al antígeno estructuralmente relacionados que posiblemente median en la señalización intracelular.

Los receptores Fc $\gamma$ , miembros de la superfamilia de proteínas de genes de las inmunoglobulinas, son glicoproteínas de la superficie que se unen a la porción Fc $\gamma$  de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce las inmunoglobulinas de uno o más isotipos a través de un dominio de reconocimiento de la cadena alfa del receptor Fc $\gamma$ . Los receptores Fc $\gamma$  se identifican por su especificidad por el subtipo de inmunoglobulina. Los receptores Fc $\gamma$  para la IgG se denominan como Fc $\gamma$ R, para la IgE como Fc $\epsilon$ R y para la IgA como Fc $\alpha$ R. Diferentes células auxiliares portan los receptores Fc $\gamma$  para los anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células auxiliares estarán implicadas en una respuesta dada (revisado por Ravetch J. V. *et al.* 1991, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92; Gerber J. S. *et al.* 2001 *Microbes and Infection*, 3: 131-139; Billadeau D. D. *et al.* 2002, *The Journal of Clinical Investigation*, 2 (109): 161-1681; Ravetch J. V. *et al.* 2000, *Science*, 290: 84-89; Ravetch J. V. *et al.*, 2001 *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275-90; Ravetch J. V. 1994, *Cell*, 78 (4): 553-60). Los diferentes receptores Fc $\gamma$ , las células que los expresan y su especificidad de isotipo, se resumen en la Tabla 1 (adaptada a partir de *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4<sup>a</sup> ed. 1999, Elsevier Science Ftd/Garland Publishing, Nueva York).

### *Receptores Fc $\gamma$*

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integral de membrana que posee dominios extracelulares y relacionados con un conjunto de dominios C2 relacionados con la inmunoglobulina, un único dominio que abarca la membrana y un dominio intracitoplasmático de longitud variable. Hay tres Fc $\gamma$ R conocidos, denominados Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). Los tres receptores son codificados por genes distintos; sin embargo, la gran homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgen a partir de un progenitor común, quizás mediante una duplicación génica.

### *Fc $\gamma$ RII (CD32)*

Las proteínas Fc $\gamma$ RII son glicoproteínas integrales de membrana de 40 kDa que se unen únicamente a la IgG complejada debido a una baja afinidad por la Ig monomérica ( $10^6$  M<sup>-1</sup>). Este receptor es el Fc $\gamma$ R expresado más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. El Fc $\gamma$ RII tiene únicamente dos regiones de tipo inmunoglobulina en su cadena de unión a la inmunoglobulina, y por lo tanto, una afinidad mucho menor por la IgG que el Fc $\gamma$ RI. Hay tres genes humanos para el Fc $\gamma$ RII (el Fc $\gamma$ RII-A, el Fc $\gamma$ RII-B, el Fc $\gamma$ RII-C), todos los cuales se unen a la IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Las distintas diferencias en los dominios citoplasmáticos del Fc $\gamma$ RII-A y del Fc $\gamma$ RII-B crean respuestas funcionalmente heterogéneas frente a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular dando lugar a la activación celular, tal como la fagocitosis y la explosión respiratoria, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitorias, por ejemplo, la inhibición de la activación de los linfocitos B.

### *Fc $\gamma$ RIII (CD16)*

Debido a la heterogeneidad en esta clase, el tamaño del Fc $\gamma$ RIII varía entre 40 y 80 kDa en el ratón y el hombre. Dos genes humanos codifican dos transcritos, el Fc $\gamma$ RIIIA, una glicoproteína integral de membrana, y el Fc $\gamma$ RIIIB, una versión unida al glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un Fc $\gamma$ RIII homólogo del Fc $\gamma$ RIIIA humano que abarca la membrana. El Fc $\gamma$ RIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos Fc $\gamma$ R. Al igual que el Fc $\gamma$ RII, el Fc $\gamma$ RIII se une a la IgG con una baja afinidad y contiene los dos correspondientes dominios extracelulares de tipo Ig. El Fc $\gamma$ RIIIA es expresado en los macrófagos, los mastocitos, y es el único Fc $\gamma$ R en los linfocitos citolíticos naturales. Actualmente se sabe que el Fc $\gamma$ RIIIB unido al GPI es expresado únicamente en los neutrófilos humanos.

### *Señalización a través de los Fc $\gamma$ R*

Las señales tanto de activación como de inhibición son transducidas a través de los Fc $\gamma$ R después de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas son el resultado de las diferencias estructurales entre las diferentes isoformas de los receptores. Dos dominios característicos en los dominios de señalización citoplasmáticos del receptor, denominados motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) o motivos de inhibición del inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM), justifican las diferentes respuestas. El reclutamiento de las diferentes enzimas citoplasmáticas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por el Fc $\gamma$ R. Los complejos del Fc $\gamma$ R que contienen los ITAM incluyen el Fc $\gamma$ RI, el Fc $\gamma$ RIIA, el Fc $\gamma$ RIIIA, mientras que los complejos que contienen los ITIM incluyen únicamente el Fc $\gamma$ RIIB.

5 Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. El agrupamiento del FcγRIIA a través de complejos inmunitarios o de una reticulación específica del anticuerpo sirve para agregar los ITAM junto con las cinasas asociadas al receptor, lo que facilita la fosforilación del ITAM. La fosforilación del ITAM sirve como sitio de anclaje para la cinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de los sustratos cascada abajo (por ejemplo, la PI3K). La activación celular da lugar a la liberación de mediadores proinflamatorios.

10 El gen FcγRIIB es expresado en los linfocitos B; su dominio extracelular es idéntico en un 96 % al FcγRIIA y se une a los complejos de IgG de una forma indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático del FcγRIIB define esta subclase inhibidora del FcγR. Recientemente se ha establecido la base molecular de esta inhibición. Cuando se co-liga junto con un FcγR de activación, el ITIM del FcγRIIB queda fosforilado y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de la cinasa de tirosina mediada por el FcγR que contiene el ITAM, impidiendo consecuentemente el flujo de entrada de Ca<sup>++</sup> intracelular. Por lo tanto, la reticulación del FcγRIIB amortigua la respuesta de activación frente a la ligación del FcγR e inhibe la sensibilidad celular. Por lo tanto, se aborta la  
15 activación del linfocito B, la proliferación del linfocito B y la secreción del anticuerpo.

**TABLA 1. Receptores de las regiones Fc de los isotipos de inmunoglobulinas**

Receptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
<b>Unión</b>	IgG1 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	IgG1 2 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	IgG1 2 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	IgG1 2 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	IgG1 5 x 10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup>	IgE 1010 M <sup>-1</sup>	IgA1, IgA2 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>
<b>Tipo de célula</b>	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas Plaquetas Células de Langerhans	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Linfocitos B Mastocitos	Linfocitos citolíticos naturales Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos	Mastocitos Eosinófilos Basófilos	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos
<b>Efecto de la ligación</b>	Captación Estimulación Activación de la explosión respiratoria Inducción de la destrucción	Captación Liberación de gránulos	Captación Inhibición de la estimulación	No hay captación Inhibición de la estimulación	Inducción de la destrucción	Secreción de gránulos	Captación Inducción de la destrucción

## Sumario de la invención

5 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona una molécula de diacuerpo según la reivindicación 1 del presente documento. La presente invención se refiere a diacuerpos covalentes y/o a moléculas covalentes de diacuerpos y a su uso en el tratamiento de una diversidad de enfermedades y de trastornos que incluyen el cáncer y las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos o virus. Preferiblemente, el diacuerpo de la presente invención puede unirse a dos epítomos diferentes de dos células diferentes, en las que el primer epítomo es expresado en un tipo de célula diferente al del segundo epítomo, de forma que el diacuerpo puede juntar las dos células.

10 El primer epítomo, el segundo epítomo y cuando sea aplicable, el tercer epítomo y el 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 el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión al epítomo, el primer epítomo y el cuarto epítomo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un tercer dominio de unión al epítomo, el segundo epítomo y el tercer epítomo pueden ser el mismo. En ciertos aspectos de la invención que comprenden un cuarto dominio de unión al epítomo, el segundo epítomo y el cuarto epítomo pueden ser el mismo. 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 epítomo y el cuarto epítomo pueden ser diferentes. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está englobada en la presente invención.

15 En algunos aspectos en particular de la invención, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. En otro aspecto más, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. En otro aspecto más, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está englobada en la presente invención.

20 En ciertos aspectos de la invención, el enlace covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo puede ser a través de un puente de disulfuro entre al menos un residuo de cisteína de la primera cadena polipeptídica y al menos un residuo de cisteína de la segunda cadena polipeptídica. El primer, el segundo, el cuarto y el quinto dominio se corresponden con las regiones variables y responsables de la unión. En las realizaciones preferidas, los residuos de cisteína responsables de la formación de los puentes de disulfuro entre la primera y la segunda cadena polipeptídica están ubicados en el tercer y en el sexto dominio, respectivamente. En un aspecto en 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 (la SEQ ID NO: 23), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23), que pueden estar codificados por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otro aspecto más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79), derivada del dominio de bisagra de una IgG humana y que pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 80). En otro aspecto de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79), derivada del dominio de bisagra de una IgG humana y que pueden estar codificados por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 80). En ciertos aspectos de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79). En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79). En otros aspectos más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio de bisagra. En otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio de bisagra. En otros aspectos más de esta realización, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el sexto dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc, o una porción del mismo. Todavía en otros aspectos de esta realización, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc, o una porción del mismo.

25 En algunas realizaciones específicas de la invención descritas *supra*, el diacuerpo covalente de la invención engloba los dímeros de las moléculas de diacuerpos, en los que cada molécula de diacuerpo comprende una primera y una

segunda cadena polipeptídica. En ciertos aspectos de esta realización, las moléculas de diacuerpos pueden estar unidas covalentemente para formar el dímero, con la condición de que el enlace covalente no sea un enlace peptídico. En algunos aspectos preferidos de esta realización, el enlace covalente es un puente de disulfuro entre al menos un residuo de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpos del dímero. En algunos aspectos referidos más de esta invención, el enlace covalente es un puente de disulfuro entre al menos un residuo de cisteína de la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpos que forman el dímero, en el que dicho al menos un residuo de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primera cadena polipeptídica.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalente, diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpos, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, primera cadena polipeptídica que comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o una porción del mismo, primer y segundo dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el primer y el segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado N terminal con respecto al primer dominio y al segundo dominio; y segunda cadena polipeptídica que comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un residuo de cisteína, cuarto y quinto dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el cuarto y el quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están unidas covalentemente, con la condición de que el enlace covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítipo; en el que segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo tetraespecífico covalente, diacuerpo que es un dímero de moléculas de diacuerpos, comprendiendo la primera molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadena polipeptídica, primera cadena polipeptídica que comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o una porción del mismo, primer y segundo dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el primer y el segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado N terminal con respecto al primer y al segundo dominio; y segunda cadena polipeptídica que comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un residuo de cisteína, cuarto y quinto dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el cuarto y el quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que el enlace covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une al primer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítipo; y la segunda molécula de diacuerpo comprende una primera y una segunda cadena polipeptídica, primera cadena polipeptídica que comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de una tercera inmunoglobulina (VL3) específica para un tercer epítipo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o una porción del mismo, primer y segundo dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el primer y el segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo y en el que el tercer dominio está ubicado N terminal con respecto al primer dominio y al segundo dominio; y segunda cadena polipeptídica que comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3) y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un residuo de cisteína, cuarto y quinto dominios que están unidos covalentemente de tal forma que el cuarto y quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo; y en el que la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente, con la condición de que el enlace covalente no sea un enlace peptídico; en el que el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL3) (VH3) que se une al tercer epítipo; en el que el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL4) (VH4) que se une al cuarto epítipo.

Como se ha analizado anteriormente, los dominios de las cadenas polipeptídicas individuales están unidos covalentemente. En algunos aspectos específicos, el enlace covalente entre el primer y el segundo dominio, el primer y el tercer dominio, el segundo y el tercer dominio, el cuarto y el quinto dominio, el cuarto y el sexto dominio

y/o el quinto y el sexto dominio puede ser un enlace peptídico. En particular, el primer y el segundo dominio, y el cuarto y el quinto dominio, pueden estar separados por el tercer dominio y el sexto dominio, respectivamente, o por residuos de aminoácidos adicionales, siempre que el primer y el segundo, y el cuarto y el quinto dominio, no se asocien para formar un sitio de unión. El número de residuos de aminoácidos puede ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de aminoácidos. En un aspecto preferido, el número de residuos de aminoácidos entre los dominios es de 8.

En ciertos aspectos de la invención, los dominios de la primera y la segunda cadena polipeptídica que comprenden un dominio Fc, es decir, opcionalmente, el tercer y el sexto dominio, respectivamente, pueden comprender adicionalmente un dominio de bisagra de forma que el dominio comprenda una región Fc de bisagra. En algunas realizaciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden comprender un dominio de bisagra sin que también comprenda un dominio Fc. Las cadenas pesadas, las cadenas ligeras, las regiones de bisagra, los dominios Fc y/o los dominios Fc de bisagra para su uso en la invención pueden derivar de cualquier tipo de inmunoglobulina, incluyendo la IgA, la IgD, la IgE, la IgG o la IgM. En un aspecto preferido, el tipo de inmunoglobulina es la IgG, o cualquier subtipo de la misma, es decir, la IgG<sub>1</sub>, la IgG<sub>2</sub>, la IgG<sub>3</sub> o la IgG<sub>4</sub>. En otros aspectos, la inmunoglobulina a partir de la cual derivan la cadena ligera y la cadena está humanizada o quimerizada.

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

En ciertos aspectos de la presente realización, al menos un sitio de unión del epítipo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico para un receptor Fc, receptor Fc que puede ser un receptor Fc de activación o un receptor Fc de inhibición. En algunos aspectos en particular, el receptor Fc es un receptor Fc<sub>γ</sub>, y el receptor Fc<sub>γ</sub> es un receptor Fc<sub>γ</sub>RI, Fc<sub>γ</sub>RII o Fc<sub>γ</sub>RIII. En algunos aspectos más preferidos, el receptor Fc<sub>γ</sub>RIII es el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIIA (CD16A) o el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIB (CD16B), y, más preferentemente, el receptor Fc<sub>γ</sub>RIII es el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIIA (CD16A). En otro aspecto preferido, el receptor Fc<sub>γ</sub>RII es el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIA (CD32A) o el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIB (CD32B), y más preferentemente el receptor Fc<sub>γ</sub>RIIB (CD32B). En un aspecto particularmente preferido, un sitio de unión del diacuerpo es específico para la CD32B y el otro sitio de unión es específico para la CD16A. En una realización específica de la invención, al menos un sitio de unión del epítipo del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo es específico para un receptor Fc de activación y al menos otro sitio es específico para un receptor Fc de inhibición. En ciertos aspectos de esta realización, el receptor Fc de activación es la CD32A y el receptor Fc de inhibición es la CD32B. En otros aspectos de esta realización, el receptor Fc de activación es el BCR y el receptor Fc de inhibición es la CD32B. En otros aspectos más de esta realización, el receptor Fc de activación es la IgE y el receptor Fc de inhibición es la CD32B.

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

En otros aspectos, un sitio de unión del epítipo puede ser específico para un antígeno patógeno. Según se usa en el presente documento, un antígeno patógeno es un antígeno implicado en una enfermedad patógena específica, incluyendo un cáncer, una infección y una enfermedad autoinmune. Por lo tanto, el antígeno patógeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico un antígeno autoinmune. Algunos ejemplos de antígenos patógenos incluyen, pero no se limitan a, lipopolisacárido, antígenos víricos seleccionados entre el grupo que consiste en los antígenos víricos del virus de la inmunodeficiencia humana, de un adenovirus, del virus respiratorio sincitial, del virus del Nilo occidental (por ejemplo, los antígenos E16 y/o E53) y del virus de la hepatitis, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferiblemente, el antígeno patógeno es un antígeno neutralizante. En un aspecto preferido, en el que un sitio de unión del epítipo es específico para la CD16A o la CD32A, el otro sitio de unión del epítipo es específico para el antígeno patógeno excluyendo los antígenos autoinmunes. En otro aspecto preferido más, cuando un sitio de unión del epítipo es específico para la CD32B, el otro sitio de unión del epítipo es específico para cualquier antígeno patógeno. En algunas realizaciones específicas, la molécula de diacuerpo de la invención se une a dos antígenos diferentes de la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión del antígeno es específico para el receptor Fc de activación, mientras que el otro es específico para el receptor Fc de inhibición. En otras realizaciones, la molécula de diacuerpo se une a dos epítipos neutralizantes víricos distintos, por ejemplo,



pero no se limita a, el E16 y el E53 del virus del Nilo occidental.

Los diacuerpos de la invención pueden usarse para el tratamiento de una diversidad de enfermedades y trastornos. Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la molécula de diacuerpo para el uso según la reivindicación 26 del presente documento. También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno que comprende la administración a un paciente en necesidad de la misma de una cantidad eficaz de un diacuerpo o de una molécula de diacuerpo covalente de la invención en los que al menos un sitio de unión es específico para 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 para un receptor Fc, por ejemplo, la CD16A.

También se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno que comprende la administración a un paciente en necesidad de la misma de una cantidad eficaz de un diacuerpo o de una molécula de diacuerpo de la invención, en los que al menos un sitio de unión es específico para la CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para la CD16A.

También se describe un método para la inducción de tolerancia inmunitaria frente a un antígeno patógeno que comprende la administración a un paciente en necesidad de una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o de una molécula de diacuerpo divalente de la invención, en los que al menos un sitio de unión es específico para la CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para dicho antígeno patógeno. El antígeno patógeno puede ser un alérgeno u otra molécula frente a la que se desee una tolerancia inmunitaria, tal como una proteína expresada sobre un tejido trasplantado.

También se describe un método de desintoxicación que comprende la administración a un paciente en necesidad de la misma de una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o de una molécula de diacuerpo de la invención, en los que al menos un sitio de unión es específico para un marcador de la superficie de una célula, y al menos otro sitio de unión es específico para una toxina. El diacuerpo de la invención administrado puede ser aquel en el que un sitio de unión es específico para un marcador de la superficie de una célula, tal como un Fc, y el otro sitio de unión es específico para una toxina bacteriana o un fármaco. El marcador de la superficie de la célula puede no encontrarse en los glóbulos rojos sanguíneos.

## Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos científicos o terminología usada en el presente documento pretenden tener los significados comprendidos habitualmente por los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con los significados comprendidos habitualmente son definidos en el presente documento por claridad y/o para facilitar la lectura, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debería interpretarse necesariamente como que representa una diferencia sustancial sobre lo que se entiende de forma general en la materia. La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, las técnicas convencionales de la biología molecular (incluyendo las técnicas recombinantes), de la microbiología, de la biología celular, de la bioquímica, de la química de ácidos nucleicos y de la inmunología, que están ampliamente en la pericia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal 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 and 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).

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

Según se usa en el presente documento, los términos "se une inmuno-específicamente", "reconoce inmuno-específicamente", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y los términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (por ejemplo, a un epítipo o a un complejo inmunitario) y

no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con una afinidad menor, según se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la materia. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no presentan reactividad cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Según se usa en el presente documento, un complejo inmunitario se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula objetivo y al menos un polipéptido heterólogo que contiene una región Fc $\gamma$  se unen entre sí formando un complejo de mayor peso molecular. Algunos ejemplos de complejos inmunitarios son los complejos antígeno-anticuerpo que pueden ser solubles o particulados (por ejemplo, un complejo antígeno/anticuerpo en la superficie de una célula).

Según se usa en el presente documento, los términos “cadena pesada”, “cadena ligera”, “región variable”, “región en marco”, “dominio constante”, y similares, tienen su significado habitual en la técnica de la inmunología y se refieren a los dominios que aparecen de forma natural en las inmunoglobulinas y a los correspondientes dominios de las proteínas de unión sintéticas (por ejemplo, recombinantes) (por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (por ejemplo, de la IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, expresado habitualmente en forma de una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La porción amino terminal (“N”) de cada cadena incluye una región variable de entre aproximadamente 100 y 110 o más aminoácidos, responsable fundamentalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi terminal (“C”) de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un único dominio constante, y teniendo habitualmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región de bisagra. Por lo tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-c, y la estructura de las cadenas pesadas de una IgG es n-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-H-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>-c (en la que H es la región de bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los residuos en contacto con el antígeno y segmentos no CDR, denominados segmentos en marco, que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de las CDR (aunque algunos residuos en marco también pueden estar en contacto con el antígeno). Por lo tanto, los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a proteínas o a anticuerpos de unión (según se define ampliamente en el presente documento), la asignación de los aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Rabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas maduras ligera y pesada de las inmunoglobulinas se designan mediante la posición de un aminoácido en la cadena. Rabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de residuos a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es extensible a los anticuerpos que no están incluidos en su compendio mediante la alineación del anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso de Rabat mediante la referencia a los aminoácidos conservados. Este método para la asignación de miembros de residuos se ha convertido en convencional en el campo e identifica con facilidad los aminoácidos en las posiciones equivalentes de diferentes anticuerpos, incluyendo variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de la cadena ligera de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón.

Según se usa en el presente documento, el término “cadena pesada” se usa para definir la cadena pesada de un anticuerpo de una IgG. En una IgG intacta natural, la cadena pesada comprende los dominios de la inmunoglobulina V<sub>H</sub>, CH1, bisagra, CH2 y CH3. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos de la cadena pesada de la IgG es la del índice EU 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 IgG1 humana EU. Algunos ejemplos de las secuencias de aminoácidos que contienen los dominios de la IgG1 humana, de la bisagra, CH2 y CH3, se muestran en las FIGS. 1A y 1B según se describe, *infra*. Las FIGS. 1A y 1B también establecen secuencias de aminoácidos de los dominios de la bisagra, CH2 y CH3 de las cadenas pesadas de la IgG2, de la IgG3 y de la IgG4. Las secuencias de aminoácidos los isotipos IgG2, IgG3 y IgG4 se alinean con la secuencia de la IgG1 mediante la colocación de los primeros y los últimos residuos de cisteína de las respectivas regiones de bisagra, que forman los enlaces de S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región de bisagra de la IgG2 y de la IgG3, no todos los residuos están numerados según el índice Eu.

La “región de bisagra” o “dominio de bisagra” se define generalmente como que se extiende desde la Glu216 hasta la Pro230 de la IgG1 humana. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra de la IgG1 humana se muestra en la FIG. 1A (los residuos de aminoácidos de la FIG. 1A están numerados según el sistema de Kabat). Las regiones de bisagra de otros isotipos de la IgG pueden ser alineadas con la secuencia de la IgG1 mediante la colocación de los primeros y los últimos residuos de cisteína que forman los enlaces de S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones a las mostradas en la FIG. 1A.

Según se usa en el presente documento, el término “región Fc”, “dominio Fc” o los términos análogos se usan para definir una región C terminal de una cadena pesada de una IgG. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana se muestra en la FIG. 1B. Aunque los límites pueden variar ligeramente, según se enumeran siguiendo el sistema de Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447 (los residuos de aminoácidos en la FIG. 1B están numerados según el sistema de Kabat). La FIG. 1B también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de la IgG, la IgG2, la IgG3 y la IgG4.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de la región Fc de una IgG humana habitualmente se extiende desde los aminoácidos 231 hasta el aminoácido 341 según el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH3 de una región Fc de una IgG humana habitualmente se extiende desde los aminoácidos 342 hasta el 447 según el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH2 de la región Fc de una IgG (denominado también dominio “C $\gamma$ 2”) es único ya que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien hay interpuertas dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas por N entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

Según se usa en el presente documento, los términos “proteína de unión al Fc $\gamma$ R”, “anticuerpo Fc $\gamma$ R” y “anticuerpo anti-Fc $\gamma$ R”, se usan de forma intercambiable y se refieren a una diversidad de proteínas de tipo inmunoglobulina o derivadas de una inmunoglobulina. Las “proteínas de unión al Fc $\gamma$ R” se unen al Fc $\gamma$ R a través de una interacción con los dominios V<sub>L</sub> y/o V<sub>H</sub> (de una forma distinta a la unión mediada por la Fc $\gamma$ ). Algunos ejemplos de proteínas de unión al Fc $\gamma$ R incluyen anticuerpos completamente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (por ejemplo, que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 ligeras), fragmentos de los mismos (por ejemplo, Fab, los fragmentos Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véase, por ejemplo, Fanzavecchia *et al.*, 1987, *Eur. J. Immunol.* 17: 105), anticuerpos de cadena única (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988, *Science* 242: 423-26), proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de expresión en fago), “minicuerpos” (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n° 5.837.821) y otras proteínas de unión al antígeno que comprenden un dominio V<sub>L</sub> y/o V<sub>H</sub> o un fragmento del mismo. En un aspecto, la proteína de unión al Fc $\gamma$ RIIIA es un “anticuerpo tetramérico” es decir, que generalmente tiene la estructura de una IgG natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que comprenden un dominio V<sub>L</sub> y un dominio constante de la cadena ligera, y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio V<sub>H</sub> y la bisagra de una cadena pesada y los dominios constantes.

Según se usa en el presente documento el término “antagonistas Fc $\gamma$ R” y los términos análogos se refieren a sustancias proteicas y no proteicas, incluyendo moléculas pequeñas que antagonizan al menos una actividad biológica de un Fc $\gamma$ R, por ejemplo, una señalización de bloqueo. Por ejemplo, las moléculas de la invención bloquean la señalización mediante el bloqueo de la unión de las IgG a un Fc $\gamma$ R.

Según se usa en el presente documento, el término “derivado” en el contexto de polipéptidos o de proteínas se refiere a un polipéptido o a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones en residuos de aminoácidos. El término “derivado” según se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido o a una proteína que ha sido modificado, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o a la proteína. Por ejemplo, pero no como limitación, un anticuerpo puede ser modificado, por ejemplo, mediante una glicosilación, una acetilación, una pegilación, una fosforilación, una amidación, una derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, una escisión proteolítica, la unión a un antígeno celular o a otra proteína, etc. Un derivado de un polipéptido o de una proteína puede producirse mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, una escisión química específica, una acetilación, una formilación, la síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido o un derivado de una proteína posee una función similar o idéntica a la del polipéptido o de la proteína a partir de la cual deriva.

Según 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 no se limita a, una molécula modificada, por ejemplo, mediante la adición o la deleción de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amino. Una molécula orgánica también puede ser esterificada, alquilada y/o fosforilada.

Según se usa en el presente documento, el término “molécula de diacuerpo” se refiere a un complejo de dos o más cadenas polipeptídicas o proteínas, comprendiendo cada una al menos un dominio VL y un VH o un fragmento de los mismos, en la que ambos dominios están comprendidos en una única cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones, la “molécula de diacuerpo” incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o un dominio Fc de bisagra. Dichas cadenas polipeptídicas del complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En algunos aspectos específicos, la “molécula de diacuerpo” incluye dímeros o tetrámeros, o dichas cadenas polipeptídicas contienen, ambas, un dominio VL y un VH. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden estar unidas covalentemente a, al menos, otro péptido del multímero mediante puentes de disulfuro intercatenarios.

Según se usa en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de forma intercambiable para referirse a una afección en un sujeto. En particular, el término “enfermedad autoinmune” se usa de forma intercambiable con el término “trastorno autoinmune” para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, en tejidos y/o en órganos causada por una reacción inmunológica del sujeto contra sus propias células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se usa de forma intercambiable con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una inflamación, preferentemente una inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden estar asociados o no a una inflamación. Además, la inflamación puede estar causada o no por un trastorno autoinmune. Por lo tanto, algunos trastornos pueden caracterizarse tanto como trastornos autoinmunes como trastornos inflamatorios.

“Cadenas polipeptídicas idénticas” según se usa en el presente documento también se refiere a las cadenas polipeptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica, por ejemplo, que incluyen cadenas que tienen diferencias en uno o más aminoácidos, preferentemente sustituciones conservativas de aminoácidos, de forma que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no es significativamente diferente.

Según se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a un neoplasma o a un tumor resultante de un crecimiento anormal descontrolado de las células. Según se usa en el presente documento, un cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas realizaciones, un cáncer se refiere a un tumor benigno que ha permanecido localizado. En otras realizaciones, un cáncer se refiere a un tumor maligno que ha invadido y destruido las estructuras corporales vecinas y se ha diseminado a sitios distantes. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con un antígeno específico del cáncer.

Según se usa en el presente documento, el término “agente inmunomodulador” y las variaciones del mismo se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un hospedador. En ciertas realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En algunas otras realizaciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunestimulante. Algunos agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Según se usa en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a un fragmento de un polipéptido o de una proteína o de 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 epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína que desencadena una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o de una proteína al que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente según se determina mediante cualquier método bien conocido por el experto en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no son necesariamente inmunogénicos.

Según se usa en el presente documento, el término “fragmento” se refiere a un péptido o a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, de al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o de al menos 250 residuos 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.

Según se usa en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos” y “secuencias de nucleótidos” incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, de ADNc o de ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, de ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y de ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN y análogos de moléculas de ADN o de ARN. Dichos análogos pueden generarse usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, bases de inosina o tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o de ARN que comprenden esqueletos modificados que proporcionan unos atributos beneficiosos a las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a la nucleasa o un aumento en la capacidad para atravesar las membranas celulares. Los ácidos nucleicos o las secuencias de nucleótidos pueden ser monocatenarias, bicatenarias, pueden contener porciones tanto monocatenarias como bicatenarias y pueden contener porciones de triple hélice, pero preferentemente es un ADN bicatenario.

Según se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o atender una enfermedad o un trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad del agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la aparición de una enfermedad, por ejemplo, para retrasar o minimizar la diseminación de un cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el

tratamiento o en la atención de una enfermedad. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto al agente terapéutico de la invención significa la cantidad del agente terapéutico, solo o junto con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o en la atención de una enfermedad.

5 Según se usa en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que pueda usarse en la prevención de un trastorno, o en la prevención de la reaparición o de la diseminación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de un agente profiláctico suficiente para prevenir la reaparición o la diseminación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente un cáncer, o la aparición de ésta en un paciente, incluyendo, pero no se limitan a, aquellos predispuestos a una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos predispuestos genéticamente al cáncer o previamente expuestos a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad de un agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la invención significa la cantidad de agente profiláctico solo, o junto con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.

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

Según se usa en el presente documento, el término “en combinación” se refiere al uso de más de un profiláctico y/o terapéutico. El uso del término “en combinación” no restringe el orden en el que el agente profiláctico y/o el agente terapéutico son administrados al sujeto con un trastorno. Un primer agente profiláctico o terapéutico puede ser administrado 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), junto 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.

Se entiende que “función efectora” según se usa en el presente documento, es un acontecimiento bioquímico resultante de la interacción de la región Fc de un anticuerpo con un receptor Fc o un antígeno. Algunas funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto aquellas que operan después de la unión de un antígeno como aquellas que operan independientemente de la unión del antígeno.

Se entiende que “célula efectora” según se usa en el presente documento, es una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores Fc y media en una o más funciones efectoras. Algunas células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos granulares grandes de Langerhans, linfocitos citolíticos naturales (NK), y pueden proceder de cualquier organismo incluyendo, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Según se usa en el presente documento, el término “se une específicamente a un complejo inmunitario” y los términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario y que 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 una afinidad menor según se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la materia. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario no presentan reactividad cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunitario pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Una “proteína de fusión estable”, según se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de fusión que experimenta un nivel de degradación entre mínimo y no detectable durante su producción y/o almacenamiento según se evalúa usando los habituales ensayos bioquímicos y funcionales conocidos por los expertos en la materia, y puede ser almacenada durante un periodo de tiempo prolongado sin ninguna pérdida en su actividad biológica, por ejemplo, la unión a un FcγR.

#### Breve descripción de los dibujos

60 **FIGS. 1 A-B SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS REGIONES CH1, BISAGRA Y Fc DE LA IgG HUMANA**

La Figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios de bisagra (A) y Fc (B) de la IgG1, de la IgG2, de la IgG3 y de la IgG4 humanas (el dominio de bisagra de la IgG1 (la SEQ ID NO: 1); el dominio de bisagra de la IgG2 (la SEQ ID NO: 2); el dominio de bisagra de la IgG3 (la SEQ ID NO: 3); el dominio de bisagra

de la IgG4 (la SEQ ID NO: 4); el dominio Fc de la IgG1 (la SEQ ID NO: 5); el dominio Fc de la IgG2 (la SEQ ID NO: 6); el dominio Fc de la IgG3 (la SEQ ID NO: 7); el dominio Fc de la IgG1 (la SEQ ID NO: 8)). Los residuos de aminoácidos mostrados en la FIGS. 1A y 1B están numerados según el sistema de numeración de Kabat EU. Las secuencias de isotipo se alinean con la secuencia de la IgG1 colocando los primeros y los últimos residuos de cisteína de las respectivas regiones de bisagra que forman los enlaces de S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la figura 1B, los residuos del dominio CH2 están indicados por +, mientras que los residuos del dominio CH3 están indicados por ~.

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

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de un anticuerpo y un dominio VH de un anticuerpo separados por un conector peptídico corto. El conector de 8 residuos de aminoácidos impide el autoensamblaje de una cadena única polipeptídica en las construcciones scFv, y en su lugar predominan las interacciones entre los dominios VL y VH de las diferentes cadenas polipeptídicas. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe a partir del amino terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hacia el carboxi terminal ("c"), lado derecho de la figura): construcción (1) (la SEQ ID NO: 9) comprendía n - el dominio VL Hu2B6 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia C terminal (LGGC) - c; construcción (2) (la SEQ ID NO: 11) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia C terminal (LGGC) - c; construcción (3) (la SEQ ID NO: 12) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia C terminal (LGGC) - c; construcción (4) (la SEQ ID NO: 13) comprendía n - el dominio VL de Hu2B6 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia C terminal (LGGC) - c.

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

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

## FIGS. 4 A-B ANÁLISIS MEDIANTE UNA SEC DE LOS DIACUERPOS PURIFICADOS POR AFINIDAD

Los diacuerpos purificados por afinidad se sometieron a un análisis mediante una SEC. (A) Perfil de elución de los patrones conocidos: la IgG de longitud completa (~ 150 kDa), el fragmento Fab de la IgG (~ 50 kDa) y el scFv (~ 30 kDa); (B) Perfil de elución del CMD h2b6, del CMD h3G8 y del CMD h2B6-h3G8.

## FIG. 5 UNIÓN DEL CBD h2B6-h3G8 A LA sCD32B Y A LA sCD16A

Se ensayó la unión del CMD h2B6-h3G8 a la sCD32B y a la sCD16A en un ELISA en sándwich. Se usó la sCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con HRP. Como control se usó el CMD h3G8, que se une a la CD16A.

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

Se ensayó la unión del CMD h2B6-h3G8, del CMD h2B6 y del CMD h3G8 a la sCD16A, la sCD32B y la sCD32A (control negativo) mediante un análisis de SPR. También se probó el scFv h3G8 como control. (A) Unión a la sCD16; (B) Unión a la sCD32B y (C) Unión a la sCD32A. Los diacuerpos se inyectaron a una concentración de 100 nM y el scFv a una concentración de 200 nM, en las superficies del receptor con un caudal de 50 ml/min durante 60 s.

## FIGS. 7 A-C ANÁLISIS DE BIACORE DE LA UNIÓN DEL DIACUERPO A LA sCD16A Y A LA sCD32B

Se ensayó la unión del CMD h2B6-h3G8, del CMD h2B6 y del CMD h3G8 a la sCD16A y la sCD32B mediante un análisis de SPR. También se probó el scFv h3G8 como control. (A) Unión del CMD h3G8 a la sCD16A; (B) Unión del CMD h2B6-h3G8 a la sCD16A; (C) Unión del scFv h3G8 a la sCD16A; (D) Unión del CMD h2B6 a la sCD32B; y (E) Unión del CMD h2B6-h3G8 a la sCD32B. Los diacuerpos se inyectaron a unas concentraciones de 6,25-200 nM en las superficies del receptor con un caudal de 70 ml/min durante 180 s.

## FIG. 8 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN DE LAS CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE COMPRENDEN LOS DOMINIOS VL Y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE UN DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE

NH<sub>2</sub> y COOH representan el amino terminal y el carboxi terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica.

S representa el residuo de cisteína C terminal de cada cadena polipeptídica. El VL y el VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas de puntos y las líneas discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las porciones del conector de dichas cadenas. El Fv h2B6 y el Fv h3G8 indican un sitio de unión del epítipo específico para la CD32B y la CD16, respectivamente.

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

Representación de las construcciones polipeptídicas de las moléculas de diacuerpos de la invención (cada construcción se describe a partir del amino terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hacia el carboxi terminal ("c"), lado derecho de la figura). La construcción (5) (la SEQ ID NO: 14) comprendía n - el dominio VL Hu2B6 - un primer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - un segundo conector (LGGC) - y un dominio Fc C terminal de la IgG1 humana - c; la construcción (6) (la SEQ ID NO: 15) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un segundo conector (LGGC) - y un dominio Fc C terminal de la IgG1 humana - c; la construcción (7) (la SEQ ID NO: 16) comprendía n - el dominio VL de Hu2B6 - un primer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia C terminal (LGGCFNRGEC) (la SEQ ID NO: 17) - c; la construcción (8) (la SEQ ID NO: 18) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un segundo conector (LGGC) - y un dominio de bisagra/Fc C terminal de la IgG1 humana (con la sustitución de aminoácido A215V) - c.

**FIG. 10 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPOS QUE COMPRENEN LOS DOMINIOS Fc A LA sCD32B Y A LA sCD16A**

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos que comprenden los dominios Fc a la sCD32B y a la sCD16A en un ELISA en sándwich. Los diacuerpos ensayados fueron producidos mediante 3 sistemas de expresión recombinantes: la cotransfección de pMGX669 y de pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; la cotransfección de pMGX667 y de pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y la cotransfección de pMGX674 y de pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. Se usó la sCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con HRP.

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

NH<sub>2</sub> y COOH representan el amino terminal y el carboxi terminal, respectivamente de cada cadena polipeptídica. S representa el al menos un puente de disulfuro entre un residuo de cisteína de la secuencia del segundo conector de cada cadena polipeptídica. El VL y el VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas de puntos y las líneas discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las porciones del conector de dichas cadenas. El CH2 y el CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. El Fv h2B6 y el Fv h3G8 indican un sitio de unión del epítipo específico para la CD32B y la CD16, respectivamente.

**FIG. 12 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPOS QUE COMPRENEN LOS DOMINIOS DE BISAGRA/Fc A LA sCD32B Y A LA sCD16A**

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos que comprenden los dominios Fc a la sCD32B y a la sCD16A en un ELISA en sándwich. Los diacuerpos ensayados fueron producidos mediante 4 sistemas de expresión recombinantes: la cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; la cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; la cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente; y la cotransfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan las construcciones 7 y 8, respectivamente. Se usó la sCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con HRP.

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

NH<sub>2</sub> y COOH representan el amino terminal y el carboxi terminal, respectivamente de cada cadena polipeptídica. S representa al menos un puente de disulfuro entre un residuo de cisteína de la secuencia de la cadena polipeptídica del segundo conector portador del Fc, 'más pesada', y un residuo de cisteína de la secuencia C terminal de la cadena polipeptídica no portadora del Fc, 'más ligera'. El VL y el VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas de puntos y las líneas discontinuas son para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras porciones del conector

de dichas cadenas más pesadas o el conector de dichas cadenas más ligeras. El CH2 y el CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. El Fv h2B6 y el Fv h3G8 indican un sitio de unión del epítipo específico para la CD32B y la CD16, respectivamente.

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

Representación de las construcciones polipeptídicas que forman las moléculas de diacuerpos de la invención (cada construcción se describe a partir del amino terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hacia el carboxi terminal ("c"), lado derecho de la figura). La construcción (9) (la SEQ ID NO: 19) comprendía n - un dominio de bisagra/Fc de la IgG1 humana - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - y una secuencia C terminal LGGC - c; la construcción (10) (la SEQ ID NO: 20) comprendía n - un dominio Fc de la IgG1 humana - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - y una secuencia C terminal LGGC - c; la construcción (11) (la SEQ ID NO: 21) comprendía n - el dominio VL de Hu2B6 (G105C) - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y un dominio de bisagra/Fc C terminal de la IgG1 humana con la sustitución de aminoácido A215V - c; la construcción (12) (la SEQ ID NO: 22) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - el conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 (G44C) - y una FNRGEC C terminal (la SEQ ID NO: 23) secuencia - c.

25 **FIG. 15 A-B ANÁLISIS MEDIANTE UNA SDS-PAGE Y UNA INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN DE LOS DIACUERPOS TETRAMÉRICOS DE AFINIDAD**

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

35 **FIG. 16 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN LOS DOMINIOS Fc y PUENTES DE DISULFURO INTERCATENARIOS MODIFICADOS A LA sCD32B Y A LA sCD16A**

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos que comprenden los dominios Fc y puentes de disulfuro modificados entre las cadenas polipeptídicas 'más ligera' y 'más pesada' a la sCD32B y a la sCD16A en un ELISA en sándwich. Los diacuerpos ensayados fueron producidos mediante 3 sistemas de expresión recombinantes: 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 sCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con HRP. Se usó la unión de h3G8 como control.

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

Representación de las construcciones polipeptídicas que comprenden las moléculas de diacuerpos de la invención (cada construcción se describe a partir del amino terminal ("n"), lado izquierdo de la construcción, hacia el carboxi terminal ("c"), lado derecho de la figura). La construcción (13) (la SEQ ID NO: 97) comprendía n - el dominio VL de 3G8 - un primer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 2.4G2VH - un segundo conector (LGGC) - un sitio de reconocimiento de furina (RAKR (la SEQ ID NO: 95)) - el dominio VL de 2.4G2 - un tercer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 3G8 - y un dominio LGGC C terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 97 se proporciona en la SEQ ID NO: 98). La construcción (14) (la SEQ ID NO: 99) comprendía n - el dominio VL de 3G8 - un primer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 2.4G2VH - un segundo conector (LGGC) - un sitio de reconocimiento de furina (RAKR (la SEQ ID NO: 95)) - un sitio de la FMD (la proteasa C3 del virus de la glosopeda) - el dominio VL de 2.4G2 - un tercer conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de 3G8 - y un dominio LGGC C terminal; (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 99 se proporciona en la SEQ ID NO: 100). La construcción (15) (la SEQ ID NO: 101) comprendía n - el dominio VL de Hu2B6 - un conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y un dominio FNRGEC C terminal (la SEQ ID NO: 23); (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 101 se proporciona en la SEQ ID NO: 102). La construcción (16) (la SEQ ID NO: 103) comprendía n - el dominio VL de Hu3G8 - un conector (GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y un dominio VEPKSC C terminal (la SEQ ID NO: 79); (la secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 103 se proporciona en la SEQ ID NO: 104).

65 **FIG. 18 UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE DIACUERPO DERIVADAS DE UNA MOLÉCULA DEL**



**PRECURSOR POLIPROTEICO A LA mCD32B Y A LA sCD16A**

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos derivadas de la construcción de la molécula del precursor poliproteico 13 (la SEQ ID NO: 97) a la CD32B murina (la mCD32B) y a la CD16A soluble (la sCD16A) en un ELISA en sándwich. Se usó la mCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con biotina.

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

Se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos que comprenden los dominios derivados del C terminal de la cadena ligera lambda humana y/o del dominio de bisagra de la IgG a la sCD32B y a la sCD16A y se comparó con las construcciones que comprenden el diacuerpo 1 y 2 (FIG. 5) en un ELISA en sándwich. Los diacuerpos ensayados fueron producidos mediante los sistemas de expresión recombinantes que expresan las construcciones 15 y 16 (la SEQ ID NO: 101 y la SEQ ID NO: 103, respectivamente). Se usó la sCD32B como la proteína objetivo. La sonda secundaria era la sCD16A conjugada con HRP. Las barras con recuadros pequeños representan la combinación de construcción 15/16, mientras que las barras con recuadros grandes representan la combinación de construcción 1/2.

**Descripción de las realizaciones preferidas**

Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio VL y un dominio VH, que están unidos covalentemente de forma que los dominios están constreñidos frente a un autoensamblaje. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos emparejamientos VL-VH, que forman dos sitios de unión del eptipoe, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio VH ni el VL están constreñidos a ninguna posición en la cadena polipeptídica, es decir, restringidos al amino (N) o carboxi (C) terminal, ni los dominios están restringidos a sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede estar N terminal con respecto al dominio VH, y viceversa. La única restricción es que haya disponible una cadena polipeptídica complementaria con objeto de formar un diacuerpo funcional. Cuando los dominios VL y VH derivan del mismo anticuerpo, las dos cadenas polipeptídicas complementarias pueden ser idénticas. Por ejemplo, cuando los dominios de unión derivan de un anticuerpo específico para el epítipo A (es decir, el dominio de unión se forma a partir de una interacción VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>), cada polipéptido comprenderá un VH<sub>A</sub> y un VL<sub>A</sub>. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas del anticuerpo dará como resultado la formación de dos sitios de unión VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>, dando como resultado un anticuerpo monoespecífico bivalente. Cuando los dominios VL y VH 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 VL<sub>A</sub> y un VL<sub>B</sub>; la homodimerización de dicha cadena dará como resultado la formación de dos sitios de unión VL<sub>A</sub>-VH<sub>B</sub>, bien sin unión o bien con una unión impredecible. Por el contrario, cuando se dejan interactuar libremente cadenas polipeptídicas diferentes, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante, una que comprende un VL<sub>A</sub> y un VH<sub>B</sub> y la otra que comprende un VL<sub>B</sub> y un VH<sub>A</sub>, se formarán dos sitios de unión diferentes: VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub> y VL<sub>B</sub>-VH<sub>B</sub>. Para todos los pares de cadenas polipeptídicas del diacuerpo, la posibilidad de una mala alineación o de una mala 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 maneja con facilidad basándose en la inmunoespecificidad del sitio de unión apropiadamente dimerizado usando cualquier método basado en afinidad conocido en el son o ejemplificado en el presente documento, por ejemplo, una cromatografía de afinidad.

En otras realizaciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprende un dominio Fc. Los dominios Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpos preferentemente dimerizan, dando como resultado la formación de una molécula de diacuerpo que muestra unas propiedades de tipo inmunoglobulina, por ejemplo, interacciones Fc-FcγR. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, por ejemplo, estar comprendidos por dos cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una, un dominio VH, un dominio VL y un dominio Fc. La dimerización de dichas cadenas polipeptídicas da como resultado un diacuerpo bivalente que comprende un dominio Fc, aunque con una estructura distinta de la del anticuerpo bivalente sin modificar (FIG. 11). Dichas moléculas de diacuerpos mostrarán unos fenotipos alterados con respecto a una inmunoglobulina natural, por ejemplo, alteraciones en la semivida sérica, en las propiedades de unión, etc. En otras realizaciones, las moléculas de diacuerpos que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Dichos tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', es decir, una cadena polipeptídica que comprende un dominio VH, un VH y un Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', es decir, una cadena polipeptídica que comprende un VL y un VH. Dichas cadenas más ligeras y más pesadas interactúan para formar un monómero, y dichos monómeros interactúan a través de sus dominios Fc no emparejados para formar una molécula de tipo Ig. Dicho diacuerpo de tipo Ig es tetravalente y puede ser monoespecífico, biespecífico o tetraespecífico.

Los al menos dos sitios de unión de la molécula de diacuerpo pueden reconocer diferentes epítipos. Los diferentes epítipos pueden ser del mismo antígeno o epítipos de antígenos diferentes. En una realización, los epítipos son de células diferentes. En otra realización, los epítipos son antígenos de la superficie celular de la misma célula o virus. Los sitios de unión de epítipos pueden reconocer cualquier antígeno contra el cual pueda generarse un anticuerpo.

Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de la superficie celular, marcadores autoinmunes, proteínas víricas, fármacos, etc. En algunos aspectos en particular, al menos un sitio de unión del epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno de una célula en particular, tal como un linfocito B o un linfocito T, una célula fagocítica, un linfocito citotóxico natural (NK) o una célula dendrítica.

Cada dominio de la cadena polipeptídica del diacuerpo, es decir, los dominios VL, VH y FC, pueden estar separados por un conector peptídico. El conector peptídico puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 aminoácidos. En ciertas realizaciones, la secuencia del conector peptídico es GGGSGGGG (la SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia del ácido nucleico (la SEQ ID NO: 76).

En ciertas realizaciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo está modificada para que comprenda al menos un residuo de cisteína que interactuará con un al menos un residuo homólogo de cisteína de una segunda cadena polipeptídica de la invención para formar un puente de disulfuro intercatenario. Dichos puentes de disulfuro intercatenarios sirven para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y la recuperación en sistemas recombinantes, dando como resultado una formulación estable y coherente. así como una mejora en la estabilidad del producto aislado y/o purificado *in vivo*. Dicho al menos un residuo de cisteína puede ser introducido en forma de un aminoácido individual o como parte de una secuencia de aminoácidos más grande, por ejemplo, un dominio de bisagra, en cualquier porción de la cadena polipeptídica. En una realización específica, dicho al menos un residuo de cisteína está modificado para que aparezca en el C terminal de la cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, dicho al menos un residuo de cisteína es introducido en la cadena polipeptídica en la secuencia de aminoácidos LGGC. En una realización específica, el 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 residuo de cisteína es introducido en el polipéptido en una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de bisagra, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 4. En una realización específica, el C terminal de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio de bisagra de una IgG, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el C terminal de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 80). En otras realizaciones, dicho al menos un residuo de cisteína es introducido en la cadena polipeptídica en la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (la SEQ ID NO: 17), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En una realización específica, el C terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (la 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 residuo de cisteína es introducido en la cadena polipeptídica en la secuencia de aminoácidos FNRGEC (la SEQ ID NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 77). En una realización específica, el C terminal de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (la SEQ ID NO: 23), que puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 77).

En ciertas 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 covalentemente por un puente de disulfuro entre los residuos 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 (la SEQ ID NO: 23), mientras que la otra comprende un dominio de bisagra (que contiene al menos un residuo de cisteína), en la que dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están unidas covalentemente por un puente de disulfuro entre el residuo de cisteína de la FNRGEC (la SEQ ID NO: 23) y un residuo de cisteína del dominio de bisagra. En algunos aspectos en particular, el residuo de cisteína responsable del puente de disulfuro ubicado en el dominio de bisagra es la Cys-128 (numerado según Kabat EU; ubicado en el dominio de bisagra de una cadena pesada de una IgG intacta sin modificar) y el residuo de cisteína homólogo en la SEQ ID NO: 23 es la Cys-214 (numerado según Kabat EU; ubicado en el C terminal de una cadena ligera de una IgG intacta sin modificar) (Elkabetz et al., 2005, J. Biol. Chem. 280: 14402-14412). En otras realizaciones más, el al menos un residuo de cisteína está modificado para que aparezca en el N terminal de la cadena de aminoácidos. En otras realizaciones más, el al menos un residuo de cisteína está modificado para que aparezca en la porción del conector de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En algunas formas de realización adicionales, el dominio VH o el VL está modificado para que comprenda al menos una modificación de aminoácido con respecto al dominio VH o VL parental, de forma que dicha modificación de aminoácido comprenda la sustitución de un aminoácido parental por cisteína.

La invención engloba moléculas de diacuerpos que comprenden un dominio Fc o una porción del mismo (por ejemplo, un dominio CH2 o un dominio CH3). El dominio Fc o una porción del mismo puede derivar de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, pero no se limita a, la IgA, la IgD, la IgG, la IgE y la IgM. En algunas realizaciones preferidas, el dominio Fc (o una porción del mismo) deriva de la IgG. En algunas realizaciones específicas, el isotipo de la IgG es la IgG1, la IgG2, la IgG3 o la IgG4 o un alotipo de las mismas. En una realización, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, dominio Fc que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 seleccionado independientemente entre cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de la IgG y el dominio CH3 derivado de la IgE, o el dominio CH2 derivado de la IgG1 y el dominio CH3 derivado de la IgG2, etc.). Dicho dominio Fc puede ser modificado en una cadena

polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la invención en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de dicha cadena polipeptídica (por ejemplo, el dominio Fc, o una porción del mismo, puede estar c terminal con respecto a los dos dominios VL y VH de la cadena polipeptídica; puede estar n terminal con respecto a los dos dominios VL y VH; o puede estar N terminal con respecto un dominio y c terminal con respecto al otro (es decir, entre los dos dominios de la cadena polipeptídica)).

La presente invención también incluye moléculas que comprenden un dominio de bisagra. El dominio de bisagra ser derivado a partir de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo la IgA, la IgD, la IgG, la IgE y la IgM. En algunas realizaciones preferidas, el dominio de bisagra deriva de la IgG, en la que el isotipo de la IgG es la IgG1, la IgG2, la IgG3 o la IgG4, o un alotipo de las mismas. Dicho dominio de bisagra puede ser modificado en una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc, de tal forma que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio de bisagra-Fc. En ciertas realizaciones, el dominio de bisagra y el Fc se seleccionan independientemente entre cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la materia o ejemplificado en el presente documento. En otras realizaciones, el dominio de bisagra y el Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, por ejemplo, el dominio VL. El dominio de bisagra, u opcionalmente el dominio de bisagra-Fc, puede ser modificado a un polipéptido de la invención en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de dicha cadena polipeptídica. En ciertas realizaciones, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio de bisagra, dominio de bisagra que está en el 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 de bisagra-Fc, dominio de bisagra-Fc que está en el C terminal de la cadena polipeptídica. En algunas formas de realización adicionales, una cadena polipeptídica de la invención comprende un dominio de bisagra-Fc, dominio de bisagra-Fc que está en el N terminal de la cadena polipeptídica.

Como se ha analizado anteriormente, la invención engloba multímeros de cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de las cadenas polipeptídicas un dominio VH y un VL. En ciertos aspectos, las cadenas polipeptídicas de dichos multímeros comprenden adicionalmente un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc da lugar a la formación de una molécula de diacuerpo que muestra una funcionalidad de tipo inmunoglobulina, es decir, una función mediada por el Fc (por ejemplo, una interacción Fc-FcγR, la unión al complemento, etc.). En ciertas realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen la misma especificidad, y dicha molécula de diacuerpo es bivalente y monoespecífica. En otras realizaciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen una especificidad diferente, y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En otras realizaciones más, las moléculas de diacuerpos de la invención engloban tetrámeros de cadenas polipeptídicas, comprendiendo cada una de las cadenas polipeptídicas un dominio VH y un VL. En ciertas realizaciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero comprenden adicionalmente un dominio Fc. Por lo tanto, el tetrámero está comprendido por dos cadenas polipeptídicas 'más pesadas', comprendiendo cada una un dominio VL, un VH y un Fc, y dos cadenas polipeptídicas 'más ligeras', que comprenden un dominio VL y un VH. La interacción de una cadena más pesada y una más ligera en un monómero bivalente, acoplada 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 tetravalente de tipo inmunoglobulina (ejemplificada en el Ejemplo 6.2 y en 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 según se describe *supra* requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Dichas interacciones son difíciles de conseguir con eficiencia en un sistema de producción recombinante de célula única, debido a las muchas variantes de los potenciales apareamientos de la cadena. Una solución para aumentar la probabilidad de apareamientos es diseñar mutaciones de tipo "nudos en orificios" en los pares de cadenas polipeptídicas deseados. Dichas mutaciones favorecen una heterodimerización con respecto a una homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones Fc-Fc, puede introducirse una sustitución de aminoácido (preferentemente una sustitución por un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un 'nudo', por ejemplo, triptófano) en el dominio CH2 o CH3, de forma que las interferencias estéricas impedirán la interacción con un dominio mutado de forma similar y obligarán al dominio mutado a emparejarse con un dominio en el que se haya modificado una mutación complementaria o de acomodación, es decir, 'el orificio' (por ejemplo, una sustitución por glicina). Dichos conjuntos de mutaciones pueden ser modificados en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo, y además, modificarse en cualquier porción de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los métodos para la modificación de proteínas para favorecer una heterodimerización con respecto a una homodimerización son bien conocidos en la materia, en particular con respecto a la modificación de moléculas de tipo inmunoglobulina, y están englobados en el presente documento (véase, por ejemplo, Ridgway et al., 1996, Protein Engr. 9: 617-621, Atwell et al., 1997, J. Mol. Biol. 270: 26-35, y Xie et al., 2005, J. Immunol. Methods 296: 95-101).

La invención también incluye moléculas de diacuerpos que comprenden dominios Fc variantes o de bisagra-Fc variantes (o una porción de los mismos), dominio Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución, una inserción, una delección) con respecto a un dominio Fc o de bisagra-Fc comparable natural (o una porción del mismo). Las moléculas que comprenden dominios Fc o de bisagra-Fc

variantes (o una porción de los mismos) (por ejemplo, anticuerpos) normalmente tienen unos fenotipos alterados con respecto a las moléculas que comprenden dominios Fc o dominios de bisagra-Fc naturales o porciones de los mismos. El fenotipo variante puede ser expresado en forma de una alteración en la semivida sérica, en la estabilidad, en la susceptibilidad a las enzimas celulares o en la función efectora, según se ensaya en un ensayo dependiente de NK o de macrófagos. Los dominios Fc variantes identificados por alterar la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y en las Solicitudes de Patentes de Estados Unidos 11/271.140 (Publicación nº US 2006-0134709), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación nº US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores.

Los diacuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse simultáneamente a dos epítomos individuales y distintos. En ciertas realizaciones, los epítomos son del mismo antígeno. En otras realizaciones, los epítomos son de diferentes antígenos. En las realizaciones preferidas, al menos un sitio de unión del epítomo es específico para un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que son expresados en los linfocitos T, en los linfocitos citotóxicos naturales (NK) o en otras células mononucleares. En una realización, la molécula de diacuerpo se une al determinante de la célula efectora y también activa dicha célula efectora. A este respecto, las moléculas de diacuerpos de la invención pueden mostrar una funcionalidad de tipo Ig independientemente de si comprenden adicionalmente un dominio Fc (por ejemplo, según se ensaya en cualquier ensayo de función efectora conocido en la materia o ejemplificado en el presente documento (por ejemplo, el ensayo de ADCC). En ciertas realizaciones, el diacuerpo biespecífico de la invención se une tanto a un oncoantígeno de una célula tumoral como a un determinante de una célula efectora mientras activa dicha célula. En algunas realizaciones alternativas, el diacuerpo biespecífico o la molécula de diacuerpo de la invención puede inhibir la activación de un objetivo, por ejemplo, de una célula efectora, mediante la unión simultánea, y por lo tanto conectando, un receptor de activación y de inhibición de la misma célula (por ejemplo, uniendo ambos de la CD32A y la CD32B, del BCR y la CD32B o del IgE1 y la CD32B) según se ha descrito *supra* (véase la Sección de Antecedentes). En un aspecto más de esta realización, el diacuerpo biespecífico puede mostrar unas propiedades antivíricas mediante la unión simultánea a dos epítomos neutralizantes de un virus (por ejemplo, epítomos del RSV; epítomos del WNV tales como E16 y E53).

En ciertas realizaciones, las moléculas de diacuerpos biespecíficos de la invención ofrecen oportunidades únicas para dirigirse a unos tipos celulares específicos. Por ejemplo, el diacuerpo biespecífico o la molécula de diacuerpo puede estar modificada para que comprenda una combinación de sitios de unión del epítomo que reconoce un conjunto de antígenos único de una célula o tipo celular objetivo. Adicionalmente, cuando alguno o ambos de los antígenos individuales es/son bastante común(es) por separado en otros tejidos y/o tipos celulares, pueden usarse dominios de unión de baja afinidad para la construcción del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo. Dichos dominios de unión de baja afinidad serán incapaces de unirse al epítomo o al antígeno individual con una suficiente avidéz para los propósitos terapéuticos. Sin embargo, cuando ambos epítomos o antígenos están presentes en una única célula o tejido objetivo, la avidéz del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo por la célula o el tejido, con respecto a una célula o tejido que expresa únicamente uno de los antígenos, estará aumentada, de forma que dicha célula o tejido puede ser efectivamente un objetivo de la invención. Dicha molécula biespecífica puede mostrar una unión aumentada a uno o ambos de sus antígenos objetivo en las células que expresan ambos de dichos antígenos con respecto a un diacuerpo mono-específico o un anticuerpo con especificidad únicamente por uno de los antígenos.

Preferiblemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la invención se caracterizan mediante ensayos funcionales *in vitro* para la determinación de la actividad de unión y/o de una o más funciones celulares efectoras del mediador FcγR (medidas a través de las interacciones Fc-FcγR o mediante la unión inmuno-específica de una molécula de diacuerpo a un FcγR) (véase la Sección 5.4.2 y la 5.4.3). Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas, por ejemplo, de los diacuerpos, de la invención, por un FcγR, pueden ser determinadas usando ensayos *in vitro* (ensayos con una base bioquímica o inmunológica) conocidos en la materia para la determinación de la unión dominio-antígeno o de las interacciones Fc-FcγR, es decir, de la unión específica de un antígeno a un dominio de unión, o de la unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, pero no se limitan a, un ensayo de ELISA, un ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación (véase la Sección 5.4.2). En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención tienen unas propiedades de unión similares en los modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en el presente documento) a las de los ensayos con una base *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no muestran el fenotipo deseado en los ensayos con una base *in vitro* pero que sí muestran el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención están modificadas para que comprendan un patrón de glicosilación alterado o una glicofoma alterada con respecto a la porción comparable de la molécula de molde. Las glicofomas modificadas pueden ser útiles en una diversidad de propósitos que incluyen, pero no se limitan a, una mejora de la función efectora. Las glicofomas modificadas pueden ser generadas mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, por ejemplo mediante el uso de cepas de expresión modificadas o variantes, mediante la coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo, la DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTI11), mediante la expresión de un diacuerpo de la invención en varios organismos o líneas celulares de varios

organismos, o mediante la modificación del (los) carbohidrato(s) después de que el diacuerpo haya sido expresado y purificado. Los métodos para la generación de glicofomas modificadas son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Umana *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol* 17: 176-180; en Davies *et al.*, 2001 *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; en Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; en Shinkawa *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473) en el documento US 6.602.684; en el documento USSN 10/277.370; en el documento USSN 10/113.929; en el documento PCT WO 00/61739A1; en el documento PCT WO 01/292246A1; en el documento PCT WO 02/311140A1; en el documento PCT WO 02/30954A1; la tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); la tecnología de modificación de la glicosilación GlycoAcMc™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza). Véase, por ejemplo, el documento WO 00061739; el documento EA01229125; el documento US 20030115614; Okazaki *et al.*, 2004, *JMB*, 336: 1239-49.

La invención 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 aquellos que usan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 2002 *Chem. Comm.* 1: 1-11; Wang *et al.*, 2001, *Science*, 292: 498-500; van Hest *et al.*, 2001. *Chem. Comm.* 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis del amino acil-ARNt, véase, por ejemplo, Tang *et al.*, 2001, *J. Am. Chem.* 123 (44): 11089-11090; Kiick *et al.*, 2001, *FEBS Lett.* 505 (3): 465.

En algunas realizaciones, la invención engloba métodos de modificación de un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la invención mediante la adición o la delección de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar los carbohidratos de las proteínas son bien conocidos en la materia y están englobados en la invención véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 6.218.149; el documento EP 0 359 096 B1; la Publicación de Estados Unidos nº US 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la Publicación de Estados Unidos nº 2003/0115614; la Patente de Estados Unidos nº 6.218.149; la Patente de Estados Unidos nº 6.472.511.

#### Dominios de unión del diacuerpo

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

La invención contempla el uso de cualquier anticuerpo conocido en la materia para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, de una enfermedad autoinmune, de una enfermedad inflamatoria o de una enfermedad infecciosa, como fuente de los dominios de unión para los diacuerpos de la invención. Algunos ejemplos no limitantes de oncoanticuerpos conocidos se proporcionan en la sección 5.7.1, así como otros anticuerpos específicos para los antígenos y anticuerpos objetivo recogidos contra los oncoanticuerpos recogidos en la sección 5.6.1; algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad autoinmune y de una enfermedad inflamatoria se proporcionan en la sección 5.7.2., así como los anticuerpos contra los antígenos y anticuerpos objetivo recogidos contra los antígenos recogidos en la sección 5.6.2; en otras realizaciones pueden usarse anticuerpos contra los epitopos asociados con enfermedades infecciosas, según se recoge en la Sección 5.6.3. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que han sido identificados mediante los métodos de la invención para que tengan una función efectora conferida y/o una afinidad aumentada por el FcγRIIB y una afinidad disminuida por el FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que comprende una región Fc natural. Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se usan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que pueden ser modificados según 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 un trastorno autoinmune se presenta en la Tabla 10.

Para algunos usos, incluyendo un uso *in vivo* de los anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para un tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden elaborarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la materia que incluyen los métodos de expresión *in fago* descritos anteriormente usando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también las Patentes de Estados Unidos nº 4.444.887 y 4.716.111; y las Publicaciones Internacionales nº 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 en marco que tiene sustancialmente la secuencia de

aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos los al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana (es decir, de un anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones en marco son las de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana.

Las regiones en marco y CDR de un anticuerpo humanizado no tienen por qué corresponder de forma precisa con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR donante o la del marco de consenso pueden estar mutadas mediante una sustitución, una inserción o una delección de al menos un residuo, de forma que el residuo de la CDR o del marco en ese sitio no se corresponda ni con la consenso ni con el anticuerpo donante. Sin embargo, dichas mutaciones preferentemente no son extensivas. Habitualmente, al menos el 75 % de los residuos de anticuerpos humanizados se corresponderán con los de la región en marco parental (FR) y las secuencias de la CDR, más a menudo el 90 % y lo más preferentemente más del 95 %. Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos usando una diversidad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, pero no se limitan a, un injerto de CDR (Patente Europea nº EP 239.400; Publicación Internacional nº WO 91/09967; y las Patentes de Estados Unidos nº 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), una inactivación o remodelación superficial (Patentes Europeas nº EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7 (6): 805-814; y Roguska *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91: 969-973), transposiciones de la cadena (Patente de Estados Unidos nº 5.565.332) y las técnicas divulgadas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, en la Publicación Internacional nº WO 9317105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119-25, Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13: 353-60, Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-79, Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-84, Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 895-904, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Sup.): 5973s-5977s, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409-10, Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959-73, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525, Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323 y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596. A menudo, los residuos en marco de las regiones en marco serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente para mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en marco son identificadas mediante métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y los residuos en marco para identificar los residuos en marco importantes para la unión al antígeno, y la comparación de la secuencia para identificar residuos en marco no habituales en unas posiciones en particular. (Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, Patente de Estados Unidos nº 5.585.089; las Publicaciones de Estados Unidos nº 2004/0049014 y 2003/0229208; las Patentes de Estados Unidos nº 6.350.861; 6.180.370; 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 y Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323).

En la realización más preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo murino donante. El experto en la materia apreciará que la invención engloba el injerto de CDR de anticuerpos en general. Por lo tanto, los anticuerpos donantes y aceptores pueden derivar de animales de la misma especie e incluso de la misma clase o subclase de anticuerpo. Sin embargo, más habitualmente, los anticuerpos donantes y aceptores derivan de animales de especies diferentes. Normalmente, el anticuerpo donante es un anticuerpo no humano, tal como un AcMc de roedor, y el anticuerpoceptor es un anticuerpo humano.

En algunas realizaciones, al menos una CDR del anticuerpo donante es injertada en el anticuerpo humano. En otras realizaciones, al menos dos y preferentemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera son injertadas en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de un bucle estructural o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, puede usarse un anticuerpo FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada con una CDR injertada y al menos una cadena ligera con una CDR injertada.

Los diacuerpos usados en los métodos incluyen derivados que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados de diacuerpos incluyen diacuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante una glicosilación, una acetilación, una pegilación, una fosforilación, una amidación, una derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, una escisión proteolítica, la unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante las técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, una escisión química específica, una acetilación, una formilación, la síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo no humano y una región constante de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; y las Patente de Estados Unidos nº 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567 y 4.816.397.

A menudo, los residuos en marco de las regiones en marco serán sustituidos por el correspondiente residuo del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en

marco son identificadas mediante métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y los residuos en marco para identificar los residuos en marco importantes para la unión al antígeno, y una comparación de la secuencia para identificar los residuos en marco no habituales en unas posiciones en particular. (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323)

Los anticuerpos monoclonales a partir de los cuales pueden prepararse los dominios de unión de los diacuerpos de la invención usando una gran diversidad de técnicas conocidas en la materia incluyen el uso de un hibridoma, de tecnologías recombinantes y de expresión en fago, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando las técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la materia y las que se enseñan, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); en Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, páginas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en el presente documento no está limitado a los anticuerpos producidos a través de la tecnología del hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procaríota o de fago, y no al método mediante el cual es producido.

Los métodos para la producción y el cribado de anticuerpos específicos usando la tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la materia. En un ejemplo no limitante, puede inmunizarse un ratón con un antígeno de interés o una célula que expresa dicho antígeno. Una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se extrae el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Después, los esplenocitos se fusionan mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada. Los hibridomas son seleccionados y clonados mediante una dilución limitante. Los clones del hibridoma se ensayan después mediante métodos conocidos en la materia para evaluar las células que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El líquido ascítico, que generalmente contiene unos elevados niveles de anticuerpos, puede ser generado mediante la inoculación de ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos. Algunos antígenos de interés incluyen, pero no se limitan a, los antígenos asociados con los cánceres proporcionados en la sección 5.8.1, los antígenos asociados con las enfermedades autoinmunes y las enfermedades inflamatorias proporcionadas en la sección 5.8.2, los antígenos asociados con las enfermedades infecciosas proporcionadas en la sección 5.8.3 y las toxinas proporcionadas en la sección 5.8.4.

Los anticuerpos también pueden ser generados usando varios métodos de expresión en fago conocidos en la materia. En los métodos de expresión en fago, los dominios de un anticuerpo funcional se expresan en la superficie de las partículas del fago que porta las secuencias de polinucleótidos que los codifica. En una realización en particular, dicho fago puede utilizarse para expresar los dominios de unión al antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado por un puente de disulfuro, expresados a partir de un repertorio o de una colección combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). La expresión en fago de un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionada o identificada con el antígeno usando, por ejemplo, un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o en una microesfera. El fago usado en estos métodos es normalmente un fago filamentoso, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión al antígeno son expresados en forma de una proteína fusionada recombinantemente en cualquiera del gen III o el gen VIII de la proteína del fago. Algunos ejemplos de métodos de expresión en fago que pueden usarse para crear inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, incluyen los divulgados en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50, 1995; en Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186, 1995; en Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958, 1994; en Persic *et al.*, *Gene*, 187: 9-18, 1997; en Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 57: 191-280, 1994; en la Solicitud PCT nº PCT/GB91/01134; en las Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y en las Patentes de Estados Unidos nº 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 expresión en fago puede usarse para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil en la obtención de anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, denominada maduración de la afinidad, emplea una mutagénesis o un desplazamiento sobre la CDR y una reelección usando el antígeno análogo para la identificación de los anticuerpos que se unen con una mayor afinidad el antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser *et al.*, 1992, *J. Immunology* 149: 3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse colecciones que consisten en un conjunto de clones variantes, cada uno de los cuales difiere por una alteración en un aminoácido individual en una CDR individual, y que contiene variantes que representan cada posible sustitución de aminoácido para cada residuo de la CDR. Los mutantes con un aumento en la afinidad de unión por el antígeno pueden ser cribados poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con el antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la materia para la identificación de los anticuerpos mutantes con un aumento en la avidéz por el antígeno (por ejemplo, un ELISA) (véase Wu *et al.*, 1998, *Proc Natl. Acad Sci. EE.UU.* 95: 6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155: 1994). También es posible un desplazamiento sobre la CDR que aleatoriza la cadena ligera (véase Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Bio.* 263: 551).

También se describe el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritos en el presente documento o conocidos en la materia con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones en marco o en una CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidéz y/o la afinidad de los dominios de unión por el FcγRIIB al que se unen inmunoespecíficamente. Pueden usarse las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno en particular.

Pueden usarse las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para la introducción de mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por una PCR, lo que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto al anticuerpo original o un fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos hechas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

#### **Diacuerpos que comprenden sitios de unión al eptiopo que se unen inmunoespecíficamente al FcγRIIB**

En una realización en particular, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la invención agoniza al menos una actividad del FcγRIIB. En una realización de la invención, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por el receptor de los linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión inhibe la activación de los linfocitos B, la proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular de los linfocitos B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de señalización cascada abajo en la ruta de transducción de señales del FcγRIIB. En otra realización más, el dominio de unión aumenta la fosforilación del FcγRIIB o el reclutamiento de la SHIP. En una realización adicional de la invención, el dominio de unión inhibe la actividad de la cinasa MAP o el reclutamiento de la Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de los linfocitos B. En otra realización, el dominio de unión agoniza la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcεRI. En una realización en particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de los mastocitos inducida por el FcεRI, la movilización de 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 del FcγRIIB, estimula el reclutamiento de la SHIP, estimula la fosforilación de la SHIP y su asociación con la She, o inhibe la activación de los miembros de la familia de la cinasa MAP (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión de la invención aumentan la fosforilación de la tirosina de p62dok y su asociación con la SHIP y la rasGAP. En otra realización, los dominios de unión de la invención inhiben la fagocitosis mediada por el FcγR en los monocitos o en los macrófagos.

En otra realización, los dominios de unión antagonizan al menos una actividad del FcγRIIB. En una realización, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por el receptor de los linfocitos B. En una realización en particular, los dominios de unión aumentan la actividad de los linfocitos B, la proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos, el flujo de entrada de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización cascada abajo en la ruta de transducción de señales del FcγRIIB. En otra realización en particular más, los dominios de unión disminuyen la fosforilación del FcγRIIB o el reclutamiento de la SHIP. En una realización adicional de la invención, los dominios de unión aumentan la actividad de la cinasa MAP o el reclutamiento de la Akt en la ruta de señalización mediada por el receptor de los linfocitos B. En otra realización, los dominios de unión antagonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcεRI. En una realización en particular, los dominios de unión aumentan la activación de los mastocitos inducida por el FcεRI, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina. En otra realización, los dominios de unión inhiben la fosforilación del FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de la SHIP, inhiben la fosforilación de la SHIP y su asociación con la She, aumentan la activación de los miembros de la familia de la cinasa MAP (por ejemplo, Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra realización más, los dominios de unión inhiben la fosforilación de la tirosina de p62dok y su asociación con la SHIP y la rasGAP. En otra realización, los dominios de unión aumentan la fagocitosis mediada por el FcγR en los monocitos o en los macrófagos. En otra realización, los dominios de unión impiden la fagocitosis, la eliminación de las partículas opsonizadas por los macrófagos esplénicos.

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

En una realización en particular, uno de los dominios de unión deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón producido mediante el clon 2B6 o 3H7, que tiene los números de registro de la ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas que producen los anticuerpos 2B6 y 3H7 han sido depositados en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedures y se les asignaron los números de registro PTA-4591 (para el hibridoma que produce el 2B6) y PTA-4592 (para el hibridoma que produce el 3H7), respectivamente. En una realización preferida, los dominios de unión son humanos o han sido humanizados, preferentemente derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.



La invención también incluye diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente al FcγRIIB, preferentemente al FcγRIIB humano, más preferentemente al FcγRIIB humano nativo, que derivan de clones que incluyen, pero no se limitan a, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números de registro de la ATCC, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los clones identificados anteriormente fueron depositados conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En las realizaciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos descritos anteriormente están humanizados.

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

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

La presente invención también incluye el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente al FcγRIIB con una afinidad mayor con la que el dominio de unión se une al FcγRIIA, que son codificados por una secuencia de nucleótidos que hibrida con la secuencia de nucleótidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en unas condiciones rigurosas. En una realización preferida, el dominio de unión se une específicamente al FcγRIIB con una afinidad mayor que al FcγRIIA y comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida en unas condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y/o de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en unas condiciones rigurosas. En otra realización preferida, los dominios de unión se unen específicamente al FcγRIIB con una afinidad mayor que al FcγRIIA y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en unas condiciones rigurosas con 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. Algunas condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, una hibridación con un ADN unido a un filtro en 6x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados con 0,2x de SSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C, unas condiciones muy rigurosas tal como una hibridación con un ADN unido a un filtro en 6x de SSC a aproximadamente 45 °C seguida de uno o más lavados con 0,1x de SSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 60 °C, o cualquier otra condición de hibridación rigurosa conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley and Sons, Inc., NY en las páginas 6.3.1 hasta 6.3.6 y 2.10.3).

También se describe el uso de dominios de unión que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios de unión descritas anteriormente con mutaciones (por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones en marco o en las CDR. Preferiblemente, las mutaciones de estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidéz y/o la afinidad de los dominios de unión por el FcγRIIB al que se unen inmuno-específicamente. Pueden usarse las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, inmunoensayos) para ensayar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno en particular.

Pueden usarse las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia para la introducción de mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, incluyendo, por ejemplo, una mutagénesis dirigida y una mutagénesis mediada por una PCR, que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto al anticuerpo

original o a un fragmento del mismo. En una realización preferida, los derivados tienen sustituciones conservativas de aminoácidos hechas en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos.

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

10 Los diacuerpos de la presente invención comprenden dominios humanizados variables específicos para el FcγRIIB en los que una o más regiones de una o más CDR de las regiones de la cadena pesada y/o ligera variable 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 al FcγRIIB, con una mayor afinidad que al 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 el 2B6, el 3H7, el 1D5, el 2E1, el 2H9, el 2D11 o el 1F2, respectivamente.

20 En una realización preferida, las regiones CDR del dominio de unión al FcγRIIB humanizado derivan de un anticuerpo murino específico para el FcγRIIB. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento comprenden alteraciones que incluyen, pero no se limitan a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, es decir, las regiones en marco del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera humana que son necesarias para conservar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donante. En algunas realizaciones, las regiones en marco de los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región en marco de una región variable de un anticuerpo humano natural, sino que contiene varias alteraciones que incluyen, pero no se limitan a, deleciones, inserciones, modificaciones de aminoácidos, que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, que mejoran las propiedades de unión de una región de un anticuerpo humanizado que es específica para el mismo objetivo que el anticuerpo murino específico para el FcγRIIB. En la mayoría de las realizaciones preferidas se realiza un número mínimo de alteraciones en la región en marco, con objeto de evitar interrupciones a gran escala de residuos en marco no humanos y para asegurar la mínima inmunogenicidad del anticuerpo humanizado en seres humanos. El anticuerpo monoclonal donante es preferentemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D 11 o 1F2.

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

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

55 En una realización específica, el diacuerpo comprende los dominios variables de un anticuerpo humanizado 2B6, 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, J. Exp. Med. 188: 2151062) y JH6 (Ravetch *et al.*, 1981, Cell 27 (3 Pt. 2): 583-91) y una o más regiones CDR del VH de 2B6, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, de la SEQ ID NO: 26 o de la SEQ ID NO: 28. En una realización, el VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. En otra realización el dominio VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VH, la SEQ ID NO: 87, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 88. En otra realización específica, el diacuerpo comprende adicionalmente una región VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de la línea germinal humana VK-A26 (Lautner-Rieske *et al.*, 1992, Eur. J. Immunol. 22: 1023-1029) y JK4 (Hieter *et al.*, 1982, J. Biol. Chem. 257: 1516-22) y una o más regiones CDR de 2B6VL, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, de la SEQ ID NO: 34, de la SEQ ID NO: 35, de la SEQ ID NO: 36 y de la SEQ ID NO: 38. En una realización, el VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; de la SEQ ID NO: 42 o de la SEQ

ID NO: 43. En una realización específica, el VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VL, la SEQ ID NO: 89, y puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEQ ID NO: 90.

En otra realización específica, el diacuerpo tiene los dominios variables de un anticuerpo humanizado 3H7, en el que la región VH consiste en los segmentos FR del segmento VH de la línea germinal humana y las regiones CDR del VH de 3H7, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SED ID NO: 37. En otra realización específica, el anticuerpo humanizado 3H7 comprende adicionalmente una regiones VL, que consiste en los segmentos FR del segmento VL de una línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7VL, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44.

En particular, los dominios de unión se unen inmunespecíficamente a los dominios extracelulares del FcγRIIB humano nativo y comprenden (o como alternativa, consisten en) las secuencias CDR de 2B6, de 3H7, de 1D5, de 2E1, de 2H9, de 2D11 o de 1F2, en cualquiera de las siguientes combinaciones: una CDR1 de un VH y una CDR1 de un VL; una CDR1 de un VH y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH y una CDR3 de un VL; una CDR2 de un VH y una CDR1 de un VL; VH CDR2 y VL CDR2; una CDR2 de un VH y una CDR3 de un VL; una CDR3 de un VH y una CDR1 de un VH; una CDR3 de un VH y una CDR2 de un VL; una CDR3 de un VH y una CDR3 de un VL; a VH1 CDR1, una CDR2 de un VH y una CDR1 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH y una CDR3 de un VL; una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH y una CDR1 de un VL, una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH y una CDR2 de un VL; una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH y una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VL; una CDR2 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR3 de un VL; una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR3 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR3 de un VL; una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR2 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL y una CDR3 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR2 de un VH, una CDR1 de un VL, una CDR2 de un VL y una CDR3 de un VL; una CDR1 de un VH, una CDR3 de un VH, una CDR1 de un VL, una CDR2 de un VL y una CDR3 de un VL; o cualquier combinación de las mismas de las CDR de un VH y de las CDR de un VL divulgadas en el presente documento.

Los anticuerpos para la derivación de los dominios de unión que van a ser incluidos en los diacuerpos de la invención pueden estar caracterizados adicionalmente por un cartografiado de epítipo, de forma que pueden seleccionarse los anticuerpos que tienen la mayor especificidad por el FcγRIIB con respecto al FcγRIIA. Los métodos de cartografiado de epítopos de los anticuerpos son bien conocidos en la materia. En ciertas realizaciones pueden usarse proteínas de fusión que comprenden una o más regiones del FcγRIIB en el cartografiado del epítipo de un anticuerpo. En una realización específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada con la porción Fc de la IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender adicionalmente sustituciones de aminoácidos y/o sustituciones de ciertas regiones del receptor por la correspondiente región de un receptor homólogo, por ejemplo, el FcγRIIA, según se muestra en la siguiente Tabla 2. El pMGX125 y el pMGX132 contienen el sitio de unión de la IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el C terminal del FcγRIIB y el último con el C terminal del FcγRIIA, y pueden usarse para diferenciar la unión C terminal. Los otros tienen sustituciones del FcγRIIA en el sitio de unión de la IgG y en el N terminal del FcγIIA o del FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula del receptor a la que se unen los anticuerpos.

**Tabla 2. Lista de las proteínas de fusión que pueden usarse para investigar el epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB. Los residuos 172 hasta 180 pertenecen al sitio de unión de la IgG del FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia del FcγRIIA están en negrita.**

Plásmido	Receptor	N terminal	172-180	SEQ ID NO:	C terminal
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	45	APS ----- SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	<b>QKFSRLDPN</b>	46	APS ----- SS (IIb)
pMGX127		IIa	<b>QKFSRLDPT</b>	47	APS ----- SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSRLDPT	48	APS ----- SS (IIb)
pMGX129		IIa	<b>QKFSHLDPT</b>	49	APS ----- SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFSHLDPT	50	APS ----- SS (IIb)

pMGX131		Ila	<b>QKFSRLDPN</b>	51	VPSMGSSS (Ila)
pMGX132		Ilb	<b>KKFSRSDPN</b>	52	VPSMGSSS (Ila)
pMGX133	RIIa-131R	Ila	<b>QKFSRLDPT</b>	53	VPSMGSSS (Ila)
pMGX134	RIIa-131H	Ila	<b>QKFSHLDPT</b>	54	VPSMGSSS (Ila)
pMGX135		Ilb	<b>KKFSRLDPT</b>	55	VPSMGSSS (Ila)
pMGX136		Ilb	<b>KKFSHLDPT</b>	56	VPSMGSSS (Ila)

Las proteínas de fusión pueden usarse en cualquier ensayo bioquímico para la determinación de la unión de un anticuerpo anti-FcγRIIB, por ejemplo, un ELISA. En otras realizaciones, la confirmación adicional de la especificidad de epítipo puede llevarse a cabo mediante el uso de péptidos con residuos específicos sustituidos por aquellos de la secuencia del FcγRIIA.

Los anticuerpos pueden ser caracterizados usando ensayos para la identificación de la función de los anticuerpos, particularmente la actividad para modular la señalización del FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización pueden medir la fosforilación de los residuos de tirosina en el motivo ITIM del FcγRIIB, o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de los linfocitos B. Los ensayos de caracterización pueden estar basados en células o ser ensayos exentos de células.

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

Los anticuerpos anti-FcγRIIB para su uso en la invención pueden caracterizarse asimismo por su capacidad para modular una o más respuestas mediadas por la IgE. Preferiblemente, se usarán líneas celulares expresen conjuntamente el receptor de alta afinidad de la IgE y el receptor de baja afinidad del FcγRIIB en la caracterización de los anticuerpos anti-FcγRIIB en la modulación de las respuestas mediadas por la IgE. En una realización específica, se usarán las células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E. L. *et al.* 1981 *Eur. J. Immunol.* 11: 317) transfectadas con el FcγRIIB humano de longitud completa. La RBL-2H3 es una línea celular de rata a bien establecida que ha sido usada ampliamente para el estudio de los mecanismos de señalización después de la activación celular mediada por la IgE. Cuando es expresado en las células RBL-2H3 y coagregar con el FcεRI, el FcγRIIB inhibe la movilización de calcio, la desgranulación y la producción de citocinas inducidos por el FcεRI (Malbec *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160: 1647; Daron *et al.*, 1995 *J. Clin. Invest.* 95: 577; Ott *et al.*, 2002 *J. of Immunol.* 168: 4430-4439).

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden ser caracterizados por la inhibición de la activación de los mastocitos inducida por el FcεRI. Por ejemplo, las células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E. L. *et al.* 1981 *Eur. J. Immunol.* 11: 317) que han sido transfectadas con el FcγRIIB son sensibilizadas con IgE y estimuladas bien con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de conejo anti-ratón, para que agreguen sólo el FcεRI, o bien con IgG de conejo anti-ratón completa para que se coagreguen el FcγRIIB y el FcεRI. En este sistema, la modulación indirecta de las moléculas de señalización cascada bajo puede ensayarse tras la adición de los anticuerpos a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, puede ensayarse la fosforilación de la tirosina del FcγRIIB y el reclutamiento y la fosforilación de la SHIP, la activación de los miembros de la familia de la cinasa MAP, incluyendo, pero no se limitan a, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de la tirosina de la p62<sup>dok</sup> y su asociación con la SHIP y la RasGAP.

Un ejemplo de ensayo para la determinación de la inhibición de la activación de los mastocitos inducida por el FcεRI por parte de los anticuerpos puede comprender lo siguiente: transfectar las células RBF-H23 con el FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBF-H23 con IgE; estimular las células RBF-H23 bien con F(ab')<sub>2</sub> de IgG de conejo anti-ratón (para agregar sólo el FcεRI y desencadenar la señalización mediada por el FcεRI, como control), o bien estimular las células RBF-H23 con IgG de conejo anti-ratón completa para (para coagregar el FcγRIIB y el FcεRI, dando como resultado la inhibición de la señalización mediada por el FcεRI). Las células que han sido estimuladas con anticuerpos de IgG de conejo anti-ratón completos pueden ser adicionalmente preincubadas con los anticuerpos. La medición de la actividad dependiente del FcεRI de las células que han sido preincubadas con los anticuerpos y de las células que han no sido preincubadas con los anticuerpos, y la comparación de los niveles de la actividad dependiente del FcεRI en estas células, indicaría una modulación de la actividad dependiente del FcεRI por

parte de los anticuerpos.

El ejemplo de ensayo descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para la identificación de los anticuerpos que bloquean la unión del ligando (la IgG) al receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcεRI, impidiendo la coagregación del FcγRIIB y el FcεRI. Este ensayo identifica, asimismo, los anticuerpos que mejoran la coagregación del FcγRIIB y el FcεRI y agonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcεRI, promoviendo la coagregación del FcγRIIB y el FcεRI.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden el dominio de unión del epítipo de los anticuerpos anti-FcγRIIB identificados descritos en el presente documento o conocidos en la materia, se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por la IgE mediante la monitorización y/o la medición de la desgranulación de los mastocitos o de los basófilos, preferentemente en un ensayo basado en células. Preferiblemente, los mastocitos o los basófilos para su uso en dichos ensayos han sido modificadas para que contengan un FcγRIIB humano usando los métodos recombinantes convencionales conocidos por un experto en la materia. En una realización específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por la IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (la enzima contenida en los gránulos) basado en células. La liberación de la β-hexosaminidasa desde los mastocitos y los basófilos es un acontecimiento primario en una afección alérgica aguda e inflamatoria (Aketani *et al.*, 2001 *Immunol. Lett.* 75: 185-9; Aketani *et al.*, 2000 *Anal. Chem.* 72: 2653-8). Puede ensayarse la liberación de otros mediadores inflamatorios que incluyen, pero no se limitan a, serotonina e histamina, para la medición de la respuesta mediada por la IgE, según los métodos del presente documento. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, la liberación de los gránulos, tales como los que contienen la β-hexosaminidasa, desde los mastocitos y los basófilos, es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que es iniciado por la reticulación de los FcγRI con un antígeno multivalente.

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

En algunas realizaciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión del FcγRIIB endógeno, según se determina usando los métodos convencionales conocidos en la materia, por ejemplo, una tinción de FACS, puede ser difícil monitorizar y/o detectar las diferencias en la activación de la ruta inhibitoria mediada por los anticuerpos anti-FcγRIIB de la invención. También se describen métodos alternativos mediante los cuales la expresión del FcγRIIB puede ser regulada por aumento usando citocinas y unas condiciones de crecimiento en particular. Se ha descrito que el FcγRIIB está muy regulado por aumento en las líneas celulares de monocitos humanos, por ejemplo, THP1 y U937 (Tridandapani *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277 (7): 5082-5089) y en monocitos humanos primarios (Pricop *et al.*, 2001, *J. of Immunol.*, 166: 531-537) por parte de la IL4. Se ha descrito que la diferenciación de las células U937 con dibutilil AMP cíclico aumenta la expresión del FcγRIIB (Cameron *et al.*, 2002 *Immunology Letters* 83, 171-179). Por lo tanto, la expresión endógena del FcγRIIB en mastocitos humanos para su uso en los métodos del presente documento puede ser regulada por aumento usando citocinas, por ejemplo, la IL-4, la IL-13, con objeto de mejorar la sensibilidad de la detección.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB también pueden ser ensayados para evaluar la inhibición de la señalización mediada por el BCR del receptor de los linfocitos. La señalización mediada por el BCR puede incluir al menos una o más respuestas biológicas cascada abajo, tales como la activación y la proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos, etc. La coagregación del FcγRIIB y el BCR da lugar a la inhibición de la progresión del ciclo celular y de la supervivencia celular. Además, la coagregación del FcγRIIB y el BCR da lugar a la inhibición de la señalización mediada por el BCR.

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

A pesar de que numerosas funciones efectoras de la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del BCR están mediadas a través de la SHIP, recientemente se ha demostrado que los linfocitos B activados por el lipopolisacárido (LPS) de ratones deficientes en la SHIP muestran una significativa inhibición mediada por el FcγRIIB

de la movilización del calcio, de la producción de Ins(1,4,5)P3 y de la fosforilación de la Erk y de la Akt (Brauweiler A. *et al.*, 2001, *Journal of Immunology*, 167 (1): 204-211). Consecuentemente, pueden usarse linfocitos B *ex vivo* de ratones deficientes en la SHIP para la caracterización de los anticuerpos. Un ejemplo de ensayo para la determinación de la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del BCR por parte de los anticuerpos puede comprender lo siguiente: aislar linfocitos B esplénicos de ratones deficientes en la SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido y estimular dichas células bien con F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM para agregar el BCR o bien con anti-IgM para coagregar el BCR con el FcγRIIB. Las células que han sido estimuladas con anti-IgM intacta para que coagreguen el BCR con el FcγRIIB pueden ser adicionalmente preincubadas con los anticuerpos. La actividad dependiente del FcγRIIB de las células puede medirse mediante las técnicas convencionales conocidas en la materia. La comparación entre el nivel de actividad dependiente del FcγRIIB en las células que han sido preincubadas con los anticuerpos y en las células que no han sido preincubadas, y la comparación de los niveles, que indicaría una modulación de la actividad dependiente del FcγRIIB por parte de los anticuerpos.

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

Los ensayos pueden usarse, por ejemplo, para la identificación de diacuerpos o de anticuerpos anti-FcγRIIB para su uso en la invención, que modulan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del BCR mediante el bloqueo del sitio de unión del ligando (la IgG) al receptor FcγRIIB y la antagonización de la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del BCR, impidiendo la coagregación del FcγRIIB y el BCR. Los ensayos también pueden usarse para la identificación de los anticuerpos que mejoran la coagregación del FcγRIIB y del BCR y que agonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del BCR.

Los anticuerpos anti-FcγRIIB también pueden ensayarse para evaluar la señalización mediada por el FcγRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación del FcγRIIB con un receptor portador del motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosina (ITAM) actúa para regular por disminución la fagocitosis mediada por el FcγR usando la SHIP como su efector (Tridandapani *et al.* 2002, *J. Biol. Chem.* 277 (7): 5082-9). La coagregación del FcγRIIA con el FcγRIIB da como resultado una rápida fosforilación del residuo de tirosina del motivo ITIM del FcγRIIB, dando lugar a una mejora en la fosforilación de la SHIP, a una asociación de la SHIP con la She y a la fosforilación de las proteínas que tienen un peso molecular de entre 120 y 60-65 kDa. Además, la coagregación del FcγRIIA con el FcγRIIB da como resultado una regulación por disminución de la fosforilación de la Akt, que es una cinasa de serina-treonina que está implicada en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

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

Otro ejemplo de ensayo para la determinación de la inhibición de la fagocitosis mediada por el FcγR en monocitos/macrófagos humanos por parte de los anticuerpos puede comprender lo siguiente: la estimulación de las células THP-1 bien con un anticuerpo Fab de ratón IV.3 anti-FcγRII y un anticuerpo de cabra anti-ratón (para agregar sólo el FcγRIIA y desencadenar la señalización mediada por el FcγRIIA); o bien con anticuerpo anti-FcγRII de ratón y anticuerpo de cabra anti-ratón (para coagregar el FcγRIIA y el FcγRIIB e inhibir la señalización mediada por el FcγRIIA). Las células que han sido estimuladas con el anticuerpo anti-FcγRII de ratón y el anticuerpo de cabra anti-ratón puede ser adicionalmente preincubadas con las moléculas de la invención. La medición de la actividad dependiente del FcγRIIA de las células estimuladas que han sido preincubadas con las moléculas de la invención y de las células que no han sido preincubadas con los anticuerpos de la invención, y la comparación de los niveles de actividad dependiente del FcγRIIA en estas células indicaría una modulación de la actividad dependiente del FcγRIIA por parte de los anticuerpos.

El ejemplo de ensayo descrito puede usarse, por ejemplo, para la identificación de los dominios de unión que bloquean la unión del ligando del FcγRIIB y que antagonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcγRIIA, impidiendo la coagregación del FcγRIIB y el FcγRIIA. Asimismo, este ensayo identifica los dominios de unión que mejoran la coagregación del FcγRIIB y el FcγRIIA y agonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcγRIIA.

Los dominios de unión del FcγRIIB de interés pueden ser ensayados cuando están comprendidos en los anticuerpos I mediante la medición de la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos sanguíneos de oveja

opsonizados con la IgG fluoresceinada (SRBC) mediante los métodos descritos previamente (Tridandapani *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ejemplo de ensayo para la medición de la fagocitosis comprende: el tratamiento de las células THP-1 con los anticuerpos del presente documento o con un anticuerpo de control que no se une al FcγRII, la comparación de los niveles de actividad de dichas células, en la que una 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 los SRBC recubiertos con IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unidos a las células THP-1) y el índice fagocítico) indicarían una modulación de la actividad dependiente del FcγRIIA por parte de los anticuerpos. Este ensayo puede usarse para la identificación, por ejemplo, de los anticuerpos que bloquean la unión del ligando del receptor FcγRIIB y antagonizan la inhibición mediada por el FcγRIIB de la fagocitosis. Este ensayo también puede identificar los anticuerpos que mejoran la inhibición mediada por el FcγRIIB de la señalización del FcγRIIA.

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

## 20 Dominios de unión a la CD16A

La siguiente sección analiza las proteínas de unión a la CD16A que pueden usarse como fuentes de las regiones variables de la cadena ligera y pesada para la producción de un díptico covalente. Las proteínas de unión a la CD16A incluyen moléculas que comprenden los dominios VL y VH de los anticuerpos anti-CD16A, dominios VH y VL que se usan en la producción de los dípticos de la presente invención.

En relación con la presente invención puede usarse una diversidad de proteínas de unión a la CD16A. Algunas proteínas de unión a la CD16A adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como los fragmentos de los anticuerpos que se unen a la CD16A (por ejemplo, el scFv o anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, minicuerpos) y otras proteínas de tipo anticuerpo que se unen a la CD16A a través de una interacción con un dominio de la región variable de la cadena ligera, un dominio de la región variable de la cadena pesada, o ambas.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a la CD16A comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con unas secuencias derivadas de un anticuerpo anti-CD16A no humano, tal como un anticuerpo de ratón anti-CD16A, y una o más regiones en marco con las secuencias en marco derivadas de una de o más inmunoglobulinas humanas. Se conoce una diversidad de anticuerpos monoclonales anti-CD16A no humanos, a partir de los cuales puede obtenerse la CDR y otras secuencias (véase, por ejemplo, Tamm y Schmidt, 1996, J. Imm. 157: 1576-81; Fleit *et al.*, 1989, pág.159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS, Reinherz *et al.*, eds. 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.*, eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman *et al.*, eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis. Además, según se muestra en los Ejemplos, pueden obtenerse nuevas proteínas de unión a la CD16A que reconozcan la CD16A expresada en células usando métodos bien conocidos para la producción y la selección de anticuerpos monoclonales o de proteínas de unión relacionadas (por ejemplo, la tecnología del hibridoma, de expresión en fago, y similares). Véase, por ejemplo, O'Connell *et al.*, 2002, J. Mol. Biol. 321: 49-56; Hoogenboom y Chames, 2000, Imm. Today 21: 371078; Krebs *et al.*, 2001, J. Imm. Methods 254: 67-84; y otras referencias mencionadas en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden ser quimerizados o humanizados usando técnicas que usan las técnicas de humanización de anticuerpos conocidas en la materia.

Alternativamente, pueden producirse anticuerpos completamente humanos contra la CD16A usando animales transgénicos que tienen elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n° 5.569.825 y 5.545.806), usando células sanguíneas periféricas humanas (Casali *et al.*, 1986, Science 234: 476), mediante el cribado de una colección de ADN de linfocitos B humanos según el protocolo general descrito por Huse *et al.*, 1989, Science 246: 1275 y mediante otros métodos.

En una realización preferida, el donante de unión es del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada del mismo, por ejemplo, tales como los que se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0010124. Se contempla que, para algunos propósitos, pueda ser ventajoso el uso de proteínas de unión a la CD16A que se unan al receptor de la CD16A en el mismo epítipo unido por el 3G8, o al menos lo suficientemente cerca de este epítipo como para que bloquear la unión mediante el 3G8. Los métodos para el cartografiado de epítipo y los experimentos de unión competitiva para la identificación de las 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, mencionado *supra*; Stahl *et al.*, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-53; Kirkland *et al.*,

1986, J. Immunol. 137: 3614-19; Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25: 7-15; Cheung et al., 1990, Virology 176: 546-52; y Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77-82. Por ejemplo, es posible determinar si dos anticuerpos se unen en el mismo sitio mediante el uso de uno de los anticuerpos para capturar el antígeno en una placa de ELISA y midiendo después la capacidad del segundo anticuerpo para unirse al antígeno capturado. La comparación entre los epítomos también puede llevarse a cabo marcando un primer anticuerpo, directa o indirectamente, con una enzima, un radionúclido o un fluoróforo, y midiendo la capacidad del segundo anticuerpo sin marcar para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno de 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 la CD16A a los complejos inmunitarios formados en placas de ELISA. Dichos complejos inmunitarios se forman recubriendo en primer lugar la placa con un antígeno tal como fluoresceína, aplicando después un anticuerpo específico anti-fluoresceína en la placa. Después, este complejo inmunitario sirve como ligando para los receptores Fc solubles, tales como el sFcRIIIa. Alternativamente, puede formarse un complejo inmunitario soluble y marcarse, directa o indirectamente, con una enzima, un radionúclido o un fluoróforo. Después, puede medirse la capacidad de los anticuerpos para inhibir la unión de estos complejos inmunitarios marcados a los receptores Fc en las células, en solución o en una fase sólida.

Las proteínas de unión a la CD16A pueden comprender o no una región Fc de una inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en las proteínas de unión al scFv. Las regiones Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos monoclonales tetraméricos de IgG humanos o humanizados. Según se ha descrito *supra*, en algunas realizaciones, la proteína de unión a la CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora alterada, por ejemplo, una afinidad reducida por un ligando efector tal como un receptor Fc o el componente C1 del complemento en comparación con una región Fc no alterada (por ejemplo, la Fc de la IgG1 natural, proteínas). En una realización, la región Fc no está glicosilada en el aminoácido de la región Fc que se corresponde con la posición 297. Dichos anticuerpos carecen de la función efectora de la Fc.

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

#### **Las proteínas de unión a la CD16A comprenden unas secuencias CDR similares a las secuencias de la CDR del AcMc 3G8.**

Las proteínas de unión a la 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 que es igual o similar a) las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Los ADNc complementarios que codifican las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8, incluyendo la CDR que codifica las secuencias, se clonaron y se secuenciaron según se describe. Las secuencias de los ácidos nucleicos y de las proteínas del 3G8 se proporcionan a continuación. Usando la región variable de ratón y las secuencias de la CDR, se produjo un gran número de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad derivadas de las CDR del 3G8, y se analizaron sus propiedades. Para identificar los anticuerpos humanizados que se unen a la CD16A con una elevada afinidad y que tienen otras propiedades deseables, se produjeron las cadenas pesadas del anticuerpo que comprenden una región VH con las CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (mediante una coexpresión) con las cadenas ligeras del anticuerpo que comprenden una región VL con las CDR derivadas de 3G8 para producir un anticuerpo tetramérico para su análisis. Las propiedades de los anticuerpos tetraméricos resultantes se determinaron como se describe a continuación. Según se describe a continuación, pueden usarse las proteínas de unión a la CD16A que comprenden las CDR del 3G8, tales como las proteínas del anticuerpo humanizado descritas en el presente documento.

#### **Región VH**

En un aspecto, la proteína de unión a la CD16A puede comprender un dominio variable de la cadena pesada en el que al menos una CDR (y habitualmente tres CDR) tiene la secuencia de una CDR (y más normalmente de las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8, y para las cuales, el resto de las porciones de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de, y sustancialmente similares a, la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un anticuerpo 3G8 humanizado o un fragmento de anticuerpo que contiene las CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en un marco sustancialmente humano, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de la cadena pesada difiere en su secuencia con respecto a la correspondiente cadena pesada de la CDR del anticuerpo de ratón 3G8. Por ejemplo, en una realización, la(s) CDR difiere(n) de la secuencia de la CDR del 3G8 por tener al menos una o más sustituciones en la CDR mostradas, conocidas en la materia, que afectan a la unión del 3G8 a la CD16A, como se sabe en la materia o según se divulga en las Tablas 3 y 4 A-H. Las proteínas de unión a la CD16 adecuadas pueden comprender 0, 1, 2, 3 o 4, o más de estas sustituciones (y a menudo tienen entre 1 y 4 de estas sustituciones) y opcionalmente también pueden tener sustituciones adicionales.



**Tabla 3. Sustituciones en el dominio V<sub>H</sub>**

Nº	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	Gin o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

**5 Tabla 4A. Secuencias del V<sub>H</sub> derivadas del V<sub>H</sub> de 3G8**

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-8	B	A	B	A	B	C	B
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B
Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-18	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B

ES 2 707 152 T3

Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B

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

**TABLA 4B**  
**FR1**

5

A	B	C	D	E		RESIDUO
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
O	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

ES 2 707 152 T3

L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
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		Se ID No

**TABLA 4C  
CDR1**

A	B		RESIDUO
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

5

**TABLA 4D  
FR2**

A	B		RESIDUO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
O	O		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		RESIDUO
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L		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	L	L	L	L		63
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

5

**TABLA 4F  
FR3**

A	B	c	D	E	F	G	H	I	J		RESIDUO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		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
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		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

ES 2 707 152 T3

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		RESIDUO
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

5

**TABLA 4H  
FR4**

A	B		RESIDUO
W	W		103
G	G		104
O	O		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, una proteína de unión a la CD16A puede comprender la secuencia de un dominio variable de la cadena pesada que es el mismo que, o similar a, el dominio VH de la construcción Hu3G8VH-1, cuya secuencia se proporciona en la SEQ ID NO: 70. Por ejemplo, puede proporcionarse una proteína de unión a la CD16A que comprende un dominio VH con una secuencia que (1) difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 (la SEQ ID NO: 70) en cero, una o más de las sustituciones de CDR establecidas en la Tabla 1; (2) difiere del dominio VH de Hu3G8VH-1 en cero, una o más de las sustituciones en marco establecidas en la Tabla 1; y (3) es idéntica en al menos aproximadamente el 80 %, a menudo en al menos aproximadamente el 90 % y a veces en al menos aproximadamente el 95 %, o incluso en al menos aproximadamente el 98 %, a la secuencia del VH de Hu3G8VH-1 en el resto de las posiciones.

Algunos ejemplos de dominios VH de las proteínas de unión a la CD16 tienen la secuencia de 3G8VH, de Hu3G8VH-5 y de Hu3G8VH-22 (la SEQ ID NO: 81, la SEQ ID NO: 71 y la SEQ ID NO: 72, respectivamente). Algunos ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican la secuencias de 3G8VH y de Hu3G8VH-5 (la SEQ ID NO: 81 y la SEQ ID NO: 71, respectivamente) son proporcionados por la SEQ ID NO: 82 y la SEQ ID NO: 83, respectivamente.

El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VH-1 (la 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 mostradas en la Tabla 3. Se cree que estas sustituciones dan como resultado un aumento en la afinidad por la CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a la CD16A cuando son administradas a seres humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad en la secuencia con el dominio VH de Hu3G8VH-1 en el resto de las posiciones 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 %.

Para ilustrar, pero no para limitar, las secuencias de una diversidad de los dominios VH de las proteínas de construcción de la CD16A se muestran en la Tabla 4. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas con la región constante de una C $\gamma$ 1 humana fueron coexpresadas con la cadena ligera de hu3G8VL-1 (descrita a continuación) para formar anticuerpos tetraméricos, y se midió la unión de los anticuerpos a la CD16A 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 elevada afinidad de unión, mostrando el hu3G8VH-6 y los dominios VH una unión intermedia. Se considera que las proteínas de unión a la CD16A que comprenden los dominios VH de hu3G8VH-5 y de hu3G8VH-22 (la SEQ ID NO: 71 y la SEQ ID NO: 72, respectivamente) tienen unas propiedades de unión particularmente favorables.

### Región VL

Se llevaron a cabo unos estudios similares para identificar las secuencias del dominio variable de la cadena ligera con unas propiedades de unión favorables. Puede proporcionarse una proteína de unión a la CD16A que contenga un dominio variable de la cadena ligera en la que al menos una CDR (y habitualmente tres CDR) tiene la secuencia de una CDR (y más normalmente de las tres CDR) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para la cual, el resto de las porciones de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de, y sustancialmente similares a, la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un fragmento de un anticuerpo 3G8 humanizado que contiene las CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en un marco sustancialmente humano, pero en el que al menos una de las CDR del dominio variable de la cadena ligera difiere en su secuencia de la CDR de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. En una realización, la(s) CDR(s) difiere(n) de la secuencia de 3G8 por tener al menos una o más sustituciones de aminoácidos en una CDR, tal como una o más de las sustituciones mostradas en la Tabla 2 (por ejemplo, una arginina en la posición 24 de la CDR1; una serina en la posición 25 de la CDR1; una tirosina en la posición 32 de la CDR1; una leucina en la posición 33 de la CDR1; ácido aspártico, triptófano o serina en la posición 50 de la CDR2; una serina en la posición 53 de la CDR2; alanina o glutamina en la posición 55 de la CDR2; una treonina en la posición 56 de la CDR2; una serina en la posición 93 de la CDR3; y/o una treonina en la posición 94 de la CDR3). En varias realizaciones, el dominio variable puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5 o más de estas sustituciones (y a menudo tiene entre 1 y 4 de estas sustituciones) y opcionalmente, puede tener asimismo sustituciones adicionales.

En una realización, una proteína de unión a la CD16A adecuada puede comprender la secuencia de un dominio variable de la cadena ligera que es la misma que, o similar a, el dominio VL de la construcción Hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73), cuya secuencia se proporciona en la Tabla 6. También se describe una proteína de unión a la CD16A que comprende un dominio VL con una secuencia que (1) difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73) en cero, una o más de las sustituciones de CDR establecidas en la Tabla 5; (2) difiere del dominio VL de Hu3G8VL-1 en cero, una o más de las sustituciones en marco establecidas en la en la Tabla 5; 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 VL de Hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73) en el resto de las posiciones.

**Tabla 5. Sustituciones en el dominio VL de 3G8**

Nº	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 Gin
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

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

5

	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

ES 2 707 152 T3

Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
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 6 B-H.

5

**TABLA 6B**  
**FR1**

A		B		RESIDUO
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	RESIDUO
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	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
67	68	69	70	71	72	73	Seq ID No

5

**TABLA 6D  
FR2**

A	RESIDUO
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

10

**TABLA 6E  
CDR2**

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESIDUO

ES 2 707 152 T3

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		RESIDUO
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
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		RESIDUO
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

5

**TABLA 6H  
FR4**

A	B		RESIDUO
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

10 Algunos ejemplos de dominios VL de las proteínas de unión a la CD16 tienen la secuencia de 3G8VL, de Hu3G8VL-1 o de Hu3G8VL-43, (la SEQ ID NO: 84, la SEQ ID NO: 73 y la SEQ ID NO: 74, respectivamente) según se muestran en las Tablas 5 y 6. Algunos ejemplos de las secuencias de nucleótidos que codifican el 3G8VL (la SEQ ID NO: 84) y el Hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73) se proporcionan en la SEQ ID NO: 85 y en la SEQ ID NO: 86, respectivamente.

15 El dominio VL puede tener una secuencia que difiere de la del Hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73) en cero, una, 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 mostradas en la Tabla 2. Se cree que estas sustituciones dan como resultado un aumento en la afinidad por la CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a la CD16A cuando son administradas a seres humanos. En ciertas realizaciones, el grado de identidad en la secuencia en el resto de las  
20 posiciones 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 %.

25 Para ilustrar, pero no para limitar, las secuencias de una diversidad de los dominios VL de las proteínas de unión a la CD16A se muestran en la Tabla 6. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas con un dominio constante de una Ck. humana fueron coexpresadas con la cadena pesada de Hu3G8VH (descrita más arriba) para formar anticuerpos tetraméricos, y se midió la unión de los anticuerpos a la CD16A para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VL de Hu3G8VL-1 (la 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 elevada afinidad de unión, y las de hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25,  
30 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron una unión intermedia. Se considera que las proteínas de unión a la CD16A

que comprenden los dominios VL de hu3G8VL-1, de hu3G8VL-22 y de hu3G8VL-43 tienen unas propiedades de unión particularmente favorables (la SEQ ID NO: 73, la SEQ ID NO: 75 y la SEQ ID NO: 74, respectivamente).

#### Combinaciones de los dominios VL y/o VH

Como es conocido en la materia y se describe en cualquier parte del presente documento, las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina puede ser expresadas recombinantemente en unas condiciones en las que se asocian para producir un diacuerpo, o también pueden combinarse *in vitro*. Por lo tanto, se apreciará que un dominio VL derivado de 3G8 descrito en el presente documento puede ser un dominio VH derivado de 3G8 combinado descrito en el presente documento para producir un diacuerpo de unión a la CD16A, y se contemplan todas estas combinaciones.

Para ilustrar, pero no para limitar, algunos ejemplos de diacuerpos de la 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, de hu3G8VH-22 o de hu3G8VH-5 (la SEQ ID NO: 70, la SEQ ID NO: 72 y la SEQ ID NO: 71, respectivamente) y el dominio VL es de hu3G8VL-1, de hu3G8VL-22 o de hu3G8VL-43 (la SEQ ID NO: 73, la SEQ ID NO: 75 y la SEQ ID NO: 43, respectivamente). En particular, los anticuerpos humanizados que comprenden el hu3G8VH-22 (la SEQ ID NO: 22) y bien, el hu3G8VL-1, el hu3G8VL-22 o el hu3G8VL-43 (la SEQ ID NO: 73, la SEQ ID NO: 72 y la SEQ ID NO: 74, respectivamente) o el hu3G8VH-5 (la SEQ ID NO: 71) y el hu3G8VL-1 (la SEQ ID NO: 73) tienen unas propiedades favorables.

Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias de los dominios VL y VH aquí descritas pueden ser adicionalmente modificadas mediante métodos conocidos en la materia tales como una maduración por afinidad (véase, Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263: 551-67; Daugherty et al., 1998, Protein Eng. 11: 825-32; Boderet al., 1997, Nat. Biotechnol. 15: 553-57; Boder et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97: 10701-705; Hudson y Souriau, 2003, Nature Medicine 9: 129- 39). Por ejemplo, las proteínas de unión a la CD16A pueden ser modificadas usando técnicas de maduración por afinidad para identificar las proteínas con un aumento en la afinidad por la CD16A y/o una disminución en la afinidad por la CD16B.

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

#### Diacuerpos que comprenden las regiones Fc o porciones de las mismas

La invención engloba moléculas de diacuerpos que comprenden dominios Fc o porciones de los mismos (por ejemplo, un dominio CH2 o CH3). En ciertas realizaciones el dominio Fc, o porción(es) del mismo, comprende uno o más dominio(s) constante(s) de la región Fc de la IgG2, de la IgG3 o de la IgG4 (por ejemplo, CH2 o CH3). En otras realizaciones, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc o una porción del mismo, en las que dicho dominio Fc o una porción del mismo comprende al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) con respecto a un dominio Fc natural comparable o una porción del mismo. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la materia y se usan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante según se ensaya en cualquiera de los ensayos de actividad de unión o de función efectora bien conocidos en la materia, por ejemplo, un ELISA, un análisis de SPR o una ADCC. Dichos dominios Fc variantes, o las porciones de los mismos, tienen uso en la presente invención al conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de diacuerpo de la invención que comprende un dominio Fc (o una porción del mismo) según se ensaya funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Los dominios Fc variantes identificados que alteran la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, en las Publicaciones de Solicitud Patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 11/271.140 (Publicación nº US 2006-0134709 A1), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación nº US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 15, 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores.

En otras realizaciones, la invención engloba el uso de cualquier variante de Fc conocida en la materia, tal como las divulgadas en Duncan et al., 1988, Nature 332: 563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147: 2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29: 53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57: 1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92: 11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44: 111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9: 115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54: 101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157: 4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29: 2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164: 4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164: 1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200: 16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166: 2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276: 6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30: 487-490; en el documento US 5.624.821; en el documento US 5.885.573; en el documento US 6.194.551; en el documento PCT WO 00/42072; en el documento PCT WO 99/58572.

En ciertas realizaciones, dicha una o más modificaciones de los aminoácidos de la región Fc reducen la afinidad y la avidéz de la región Fc, y por lo tanto, de la molécula de diacuerpo de la invención, para uno o más receptores FcγR. En una realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o una porción de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es el FcγRIIIA. En otra realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o una porción de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es el FcγRIIA. En otra realización específica, la invención engloba diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o una porción de la misma, en la que dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc natural, región Fc variante que sólo se une a un FcγR, en la que dicho FcγR es el FcγRIIB. En ciertas realizaciones, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc variante en la que dicha variante confiere o media en un aumento en la actividad de ADCC y/o un aumento en la unión al FcγRIIA (CD32A), con respecto a una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc natural, según se mide mediante el uso de los métodos conocidos por un experto en la materia y descritos en el presente documento. En algunas realizaciones alternativas, la invención engloba moléculas que comprenden un dominio Fc variante en la que dicha variante confiere o media en una disminución de la actividad de ADCC (o de otra función efectora) y/o un aumento en la unión al FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc natural, según se mide mediante el uso de los métodos conocidos por un experto en la materia y descritos en el presente documento.

También se describe el uso de un dominio Fc que comprende dominios o regiones de dos o más isotipos de la IgG. Como se sabe en la materia, la modificación de aminoácidos en la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora mediada por el Fc y/o a la actividad de unión. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales pueden ser adicionalmente refinadas y/o manipuladas cuando son implementadas en el contexto de isotipos seleccionados de la IgG. De forma análoga, las características nativas del isotipo Fc pueden ser manipuladas mediante la una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos de la IgG (es decir, la IgG1, la IgG2, la IgG3 y la IgG4) muestran diferentes propiedades físicas y funcionales que incluyen la semivida sérica, la fijación del complemento, las afinidades de unión por el FcγR y las actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios de bisagra y/o Fc. En ciertas realizaciones, la modificación de los aminoácidos y de la región Fc de la IgG son seleccionadas independientemente basándose en sus respectivas actividades individuales de unión y/o de función efectora con objeto de modificar un diacuerpo con las características deseadas. En la mayoría de las realizaciones, dichas modificaciones de aminoácidos y de las regiones de bisagra/Fc de la IgG se han ensayado por separado para evaluar la actividad de unión y/o de función efectora según se describe en el presente documento o es conocido en la materia en el contexto de una IgG1. En ciertas realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y de la región de bisagra/Fc de la IgG muestra una funcionalidad similar, por ejemplo, un aumento en la afinidad por el FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para evaluar la unión al FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo o de otra molécula que contiene un Fc (por ejemplo, y una inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácidos y de la región Fc de la IgG seleccionada actúa entonces de forma aditiva, o más preferentemente, sinérgicamente, para modificar dicha funcionalidad en la molécula de diacuerpo de la invención, con respecto a una molécula de diacuerpo de la invención que comprende una región Fc natural. En otras realizaciones, dicha modificación de aminoácidos y de la región Fc de la IgG muestra unas funcionalidades opuestas, por ejemplo, una afinidad aumentada y disminuida, respectivamente, por el FcγRIIA, cuando se ensayan por separado para evaluar la unión al FcγR y/o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo o de otra molécula que contiene un Fc (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprende una región Fc natural según se describe en el presente documento o se sabe en la materia; la combinación de dichas modificaciones de aminoácidos y región seleccionada de la IgG "opuestas" actúa entonces para moderar 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 natural del mismo isotipo. También se describen regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de modificaciones de aminoácidos conocidas en la materia y regiones seleccionadas de la IgG que muestran unas nuevas propiedades, propiedades que no eran detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se ensayaban independientemente según se describe en el presente documento.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de la IgG y de los dominios de las mismas, son bien conocidas en la materia. Las secuencias de aminoácidos de la IgG1, de la IgG2, de la IgG3 y de la IgG4 se presentan en las FIGS. 1A-1B. La selección y/o las combinaciones de dos o más dominios de unos isotipos específicos de la IgG para su uso en los métodos del presente documento pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos parentales, incluyendo la afinidad por el FcγR (Tabla 7; Fleisch y Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14: 141-156; Chappel et al., 1993, J. Biol. Chem. 33: 25124-25131; Chappel et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o de dominios de isotipos de la IgG que muestran una unión limitada o ninguna unión al FcγRIIB, por ejemplo, de la IgG2 o de la IgG4, pueden hallar un uso en particular cuando se desea un diacuerpo que va a ser modificado para maximizar la unión a un receptor de activación y minimizar la unión a un receptor de inhibición. De forma análoga, el uso de regiones Fc o de dominios de los isotipos de la IgG conocidos por unirse preferentemente al C1q o al FcγRIIIA, por ejemplo, la IgG3 (Brüggemann et al., 1987, J. Exp. Med 166: 1351-1361), puede combinarse con modificaciones de aminoácidos del Fc conocidas en la materia

por mejorar la ADCC, para modificar una molécula de diacuerpo de forma que se maximice la actividad de la función efectora, por ejemplo, la activación del complemento o la ADCC.

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

Receptor	Afinidad estimada por la IgG (M <sup>-1</sup> )	Afinidad relativa
FcγRI	10 <sup>8</sup> – 10 <sup>9</sup>	IgG3 > IgG1 >> IgG4 No hay unión: IgG2
FcγRIIA R <sup>131A</sup>	< 10 <sup>7</sup>	IgG3 > IgG1 No hay unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA H <sup>131A</sup>	< 10 <sup>7</sup>	IgG3 > IgG1 > IgG2 No hay unión: IgG4
FcγRIIB <sup>A</sup>	< 10 <sup>7</sup>	IgG3 > IgG1 > IgG4 No hay unión: IgG2
FcγRIII	< 10 <sup>7</sup>	IgG3 = IgG1 No hay unión: IgG2, IgG4

<sup>A</sup> sólo se une a la IgG complejada

## 10 Conjugados moleculares

Las moléculas de diacuerpos de la invención pueden fusionarse recombinantemente o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o una porción del mismo, preferentemente al menos a 10, al menos a 20, al menos a 30, al menos a 40, al menos a 50, al menos a 60, al menos a 70, al menos a 80, al menos a 90 o al menos a 100 aminoácidos del polipéptido, para generar las proteínas de fusión. La fusión no tiene por qué ser necesariamente directa, pero puede producirse a través de secuencias conectoras.

Además, las moléculas de diacuerpos de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden estar conjugadas con un agente terapéutico o una fracción farmacológica que modifica una respuesta biológica dada. Como una alternativa a la conjugación directa, debido a los múltiples sitios de unión del epítipo de las moléculas de diacuerpos de la invención multivalentes, por ejemplo, tetravalentes, al menos una región de unión del diacuerpo puede estar diseñada para unirse al agente terapéutico o a la fracción farmacológica deseada sin afectar a la unión del diacuerpo.

Los agentes terapéuticos o las fracciones farmacológicas no deben ser interpretados como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como la abrina, la ricina A, la exotoxina de *Pseudomonas* (es decir, la PE-40) o la toxina diftérica, la ricina, la gelonina y la proteína antiviral de *Phytolacca americana*, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, pero no se limitan a, el interferón α (IFN-α), el interferón β (IFN-β), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el activador tisular del plasminógeno (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, el TNF-α, el TNF-β, el AIM I según se divulga en la Publicación PCT n° WO 97/33899), el AIM II (véase la Publicación PCT n° WO 97/34911), el ligando Fas (Takahashi *et al.*, *J. Immunol.* 6: 1567-1574, 1994) y el VEGF (Publicación PCT n° WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, la angiostatina o la endostatina) o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (por ejemplo, la interleucina-1 ("IL-1"), la interleucina-2 ("IL-2"), la interleucina-6 ("IL-6"), el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y el factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), el factor estimulante de las colonias de macrófagos ("M-CSF") o un factor de crecimiento (por ejemplo, la hormona de crecimiento ("GH"); proteasas o ribonucleasas.

Las moléculas de diacuerpos de la invención (es decir, los polipéptidos) pueden estar fusionadas con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En las realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Según se describe en Gentz *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, *Cell*, 37: 767 1984) y la etiqueta "flag" (Knappik *et al.*, *Biotechniques*, 17 (4): 754-761, 1994).

Algunas proteínas de fusión adicionales pueden ser generadas a través de las técnicas de transposiciones genéticas, de transposiciones de motivo, de transposiciones de exón y/o de transposiciones de codón (denominadas en conjunto "transposiciones de ADN"). Las transposiciones de ADN pueden emplearse para alterar las actividades

de las moléculas de la invención (por ejemplo, los sitios de unión del epítipo con unas mayores afinidades y unos menores índices de disociación). Véanse, de forma general, las Patentes de Estados Unidos nº 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Patten *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16: 76; Hansson, *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 265; y Lorenzo y Blasco, 1998, *BioTechniques* 24: 308. Las moléculas de diacuerpos de la invención, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención, puede ser alteradas adicionalmente sometiénolas a mutagénesis aleatorias o mediante una PCR proclive a errores, una inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos previos a la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención pueden ser recombinadas con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente invención también incluye moléculas de diacuerpos de la invención conjugadas con, o que reconocen inmuno específicamente, un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la cual se desea aumentar/disminuir la semivida sérica y/o ser dirigida a un subconjunto en particular de células. Las moléculas de la invención pueden usarse en diagnóstico, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, de un trastorno o de una infección, como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a una sustancia detectable o mediante las moléculas que reconocen inmuno específicamente la sustancia detectable. Algunos ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable puede estar acoplada o conjugada bien directamente con las moléculas de la invención o bien indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la materia) usando técnicas conocidas en la materia, o la molécula puede reconocer inmuno específicamente la sustancia detectable: unirse inmuno específicamente a dicha sustancia. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 4.741.900 para los iones metálicos que pueden ser conjugados con los anticuerpos para su uso en diagnóstico. Dicho diagnóstico y detección puede llevarse a cabo diseñando las moléculas para que reconozcan inmuno específicamente la sustancia detectable o mediante el acoplamiento de las moléculas de la invención a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, varias enzimas, enzimas que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos complejos tales como, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes tales como, pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos tales como, pero no se limitan a, bismuto ( $^{213}\text{Bi}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), cromo ( $^{51}\text{Cr}$ ), cobalto ( $^{57}\text{Co}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ), gadolinio ( $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), germanio ( $^{68}\text{Ge}$ ), holmio ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ), yodo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{127}\text{I}$ ), lantano ( $^{140}\text{La}$ ), lutecio ( $^{177}\text{Lu}$ ), manganeso ( $^{54}\text{Mn}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), fósforo ( $^{32}\text{P}$ ), praseodimio ( $^{142}\text{Pr}$ ), promecio ( $^{149}\text{Pm}$ ), renio ( $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ), rodio ( $^{105}\text{Rh}$ ), rutenio ( $^{97}\text{Ru}$ ), samario ( $^{153}\text{Sm}$ ), escandio ( $^{47}\text{Sc}$ ), selenio ( $^{75}\text{Se}$ ), estroncio ( $^{85}\text{Sr}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), estaño ( $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), iterbio ( $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ), itrio ( $^{90}\text{Y}$ ), cinc ( $^{65}\text{Zn}$ ); metales emisores de positrones que usan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

Las moléculas de diacuerpos de la invención pueden reconocer inmuno específicamente, o estar conjugadas a, una fracción terapéutica tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radioactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromo manitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, una molécula de diacuerpo de la invención puede ser conjugada con, o estar diseñada para reconocer inmuno específicamente, fracciones terapéuticas tales como materiales radioactivos o quelantes macrocíclicos útiles para la conjugación de iones radiometálicos (véase anteriormente para los ejemplos de materiales radioactivos). En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N,N',N'-tetraacético (DOTA), que puede ser unido al polipéptido a través de una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son conocidas habitualmente en la materia y se describen en Denardo *et al.*, 1998, *Clin Cancer Res.* 4: 2483-90; Peterson *et al.*, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10: 553; y Zimmerman *et al.*, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26: 943-50.

Las técnicas para la conjugación de dichas fracciones terapéuticas a polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, los dominios Fc, son bien conocidas; véase, por ejemplo, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of

Drugs In Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, páginas 243-56, Alan R. Fiss, Inc.); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), 1987, páginas 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, páginas 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, páginas 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58, 1982.

La molécula de diacuerpo de la invención puede ser administrada con o sin una fracción terapéutica conjugada a ella, administrada sola o junto con factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s) para su uso como un tratamiento terapéutico. Cuando se administra sola, al menos un epítipo de una molécula de diacuerpo multivalente, por ejemplo, tetravalente, puede estar diseñado para reconocer inmunoespecíficamente un agente terapéutico, por ejemplo, factor(es) citotóxico(s) y/o citocina(s), que puede ser administrado simultáneamente o posteriormente a la molécula de la invención. De esta forma, la molécula de diacuerpo puede dirigirse específicamente al agente terapéutico de una forma similar a una conjugación directa. Alternativamente, una molécula de la invención puede estar conjugada con un anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo según describe Segal en la Patente de Estados Unidos nº 4.676.980. Las moléculas de diacuerpo de la invención también pueden estar unidas a soportes sólidos, que son útiles particularmente para inmunoensayos o para la purificación del antígeno objetivo. Dichos soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

### Caracterización de la unión de las moléculas de diacuerpos

Las moléculas de diacuerpos de la presente invención pueden ser caracterizadas de una diversidad de formas. En particular, puede ensayarse la capacidad de las moléculas de la invención para unirse inmunoespecíficamente a un antígeno, por ejemplo, el FcR1IIIA o el FcR1IIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o una porción del mismo), la capacidad de mostrar interacciones Fc-FcγR, es decir, una unión específica de un dominio Fc (o una porción del mismo) a un FcγR. Dicho ensayo puede llevarse a cabo en solución (por ejemplo, Houghten, *Bio/Techniques*, 13: 412-421, 1992), en microesferas (Lam, *Nature*, 354: 82-84, 1991, en chips (Fodor, *Nature*, 364: 555-556, 1993), en bacterias (Patente de Estados Unidos nº 5.223.409), en esporas (Patentes de Estados Unidos nº 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89: 1865-1869, 1992) o en un fago (Scott y Smith, *Science*, 249: 386-390, 1990; Devlin, *Science*, 249: 404-406, 1990; Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87: 6378-6382, 1990; y Felici, *J. Mol. Biol.*, 222: 301-310, 1991). Las moléculas que han sido identificadas por unirse inmunoespecíficamente a un antígeno, por ejemplo, el FcγR1IIIA, pueden ensayarse después para evaluar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Las moléculas de la invención que han sido diseñadas para que comprendan múltiples dominios de unión al epítipo pueden ser ensayadas para evaluar su unión inmunoespecífica a uno o más antígenos (por ejemplo, oncoantígenos y reactividad cruzada con otros antígenos (por ejemplo, FcγR)) o, cuando las moléculas comprenden un dominio Fc (o una porción del mismo), para evaluar las interacciones Fc-FcγR mediante cualquier método conocido en la materia. Algunos inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica, la reactividad cruzada y las interacciones Fc-FcγR incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como inmunotransferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática), inmunoensayos en “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones de difusión en gel de precipitina, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de la proteína A, por nombrar unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión y la disociación de la interacción antígeno-dominio de unión o de la interacción Fc-FcγR puede ser determinada mediante ensayos de unión competitivos. Un ejemplo de un ensayo de unión competitivo es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado, tal como el FcγR tetramérico (por ejemplo, <sup>3</sup>H o I<sup>125</sup> véase la Sección 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 sin marcar, tal como el FcγR tetramérico (véase la Sección 5.4.1) y la detección de la molécula unida al antígeno marcado. La afinidad de la molécula de la presente invención por un antígeno y las disociaciones de la unión pueden ser determinadas a partir de los datos de la saturación mediante un análisis de Scatchard.

Las afinidades y las propiedades de unión de las moléculas de la invención por un antígeno o un FcγR pueden determinarse inicialmente usando ensayos *in vitro* (ensayos con una base bioquímica o inmunológica) conocidos en la materia para evaluar las interacciones antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR, que incluyen, pero no se limitan a, un ensayo ELISA, un ensayo de resonancia de plasmón superficial, ensayos de inmunoprecipitación. Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas de la invención también son caracterizadas mediante ensayos funcionales *in vitro* para la determinación de una o más de las funciones celulares efectoras mediadas por el FcγR, según se describe en la sección 5.4.2. En la mayoría de las realizaciones preferidas, las moléculas de la invención tienen unas propiedades de unión similares en los modelos *in vivo* (tales como las descritas y divulgadas



en el presente documento) a las de los ensayos con una base *in vitro*. Sin embargo, la presente invención no excluye las moléculas de la invención que no muestran el fenotipo deseado en los ensayos con una base *in vitro* pero que sí muestran el fenotipo deseado *in vivo*.

5 En algunas realizaciones, el cribado y la identificación de las moléculas que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o porciones de los mismos) se realizan ensayos con una base funcional, preferentemente de una forma de alto rendimiento. Los ensayos con una base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la materia para la caracterización de una o más funciones celulares efectoras mediadas por el FcγR tales como las descritas en el presente documento en las Secciones 5.4.2 y 5.4.3. Algunos ejemplos no limitantes de funciones celulares efectoras que pueden usarse según los métodos del presente documento incluyen, pero no se limitan a, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis dependiente de anticuerpo, la fagocitosis, la opsonización, la opsonofagocitosis, la unión celular, la formación de rosetas, la unión al C1q y la citotoxicidad celular dependiente del complemento.

15 En una realización preferida, se usa un análisis cinético de BIAcore para la determinación de los índices de unión y de disociación de las moléculas de la presente invención a un antígeno o y al FcγR. El análisis cinético de BIAcore comprende el análisis de la unión y la disociación de un antígeno o del FcγR de chips con moléculas inmovilizadas (por ejemplo, moléculas que comprenden un dominio de unión al epítipo o dominios Fc (o porciones de los mismos), respectivamente) en su superficie. El análisis de BIAcore se describe en la Sección 5.4.3.

20 Preferiblemente, se usa una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), usando cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la materia, para un ensayo con una base inmunológica o funcional para la caracterización de las moléculas de la invención. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente un gran número de células individuales que han sido unidas, por ejemplo, opsonizadas, por las moléculas de la invención (por ejemplo, 10-100 millones de células por hora) (Shapiro *et al.*, *Practical Flow Cytometry*, 1995). Adicionalmente, algunos parámetros específicos usados para la optimización del comportamiento del diacuerpo, incluyen, pero no se limitan a, la concentración del antígeno (es decir, el complejo FcγR tetramérico, véase la Sección 5.4.1), el tiempo de competición cinética o una FACS rigurosa, cada uno de los cuales puede ser modificado con objeto de seleccionar las moléculas de diacuerpos que comprenden las moléculas de la invención que muestran las propiedades de unión específicas, por ejemplo, la unión simultánea a múltiples epítopos. Los citómetros de flujo para la clasificación y el análisis de células biológicas son bien conocidos en la materia. Algunos citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos nº 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.

35 La caracterización de la afinidad de unión del antígeno objetivo o de la afinidad de unión del Fc-FcγR y la evaluación de la densidad del antígeno objetivo o del FcγR en la superficie de una célula puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la materia, tales como un análisis de Scatchard o mediante el uso de kits según las instrucciones del fabricante, tales como Quantum™ Simply Cellular® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). El uno o más ensayos funcionales puede ser cualquier ensayo conocido en la materia para la caracterización de una o más funciones celulares efectoras mediadas por el FcγR según conocen los expertos en la materia o se describen en el presente documento. En algunas realizaciones específicas, las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o una porción del mismo) se ensayan en un ensayo ELISA para evaluar la unión de uno o más antígenos objetivo a uno o más FcγR, por ejemplo, al FcγRIIIA, al FcγRIIA, al FcγRIIA; seguido de uno o más ensayos de ADCC. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se ensayan adicionalmente usando un ensayo basado en la resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore. Los ensayos basados en la resonancia de plasmón superficial son bien conocidos en la materia y se analizan adicionalmente en la Sección 5.4.3 y se ejemplifican en el presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 6.1.

50 En las realizaciones más preferidas, las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente un dominio Fc (o una porción del mismo) son caracterizadas tradicionalmente en un modelo animal para la interacción con un antígeno objetivo (por ejemplo, un FcγR) o para una interacción Fc-FcγR. Cuando se van a evaluar las interacciones Fc-FcγR, algunos modelos animales preferidos para su uso en los métodos del presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos, por ejemplo, cualquier modelo de ratón descrito en las Patentes de Estados Unidos nº 5.877.397 y 6.676.927. Algunos ratones transgénicos adicionales para su uso en dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA portadores del FcγRIIIA humano; ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA portadores del FcγRIIA humano; ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA portadores del FcγRIIB humano y del FcγRIIA humano; ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA portadores del FcγRIIB humano y del FcγRIIA humano; ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA y el FcγRIIA portadores del FcγRIIIA humano y del FcγRIIA humano, y ratones atímicos inactivados para el FcγRIIIA, el FcγRIIA y el FcγRIIB portadores del FcγRIIIA, del FcγRIIA y del FcγRIIB humanos.

65 **Ensayos de unión que comprenden el FcγR**

La caracterización de la unión al FcγR por parte de las moléculas que comprenden un dominio Fc (o una porción del mismo) y/o que comprenden un dominio de unión al epítipo específico para un FcγR puede llevarse a cabo usando cualquier FcγR, incluyendo, pero no se limitan a, las variantes polimorfas del FcγR. En algunas realizaciones usa una variante polimorfa del FcγRIIIA, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras realizaciones, la caracterización se lleva a cabo usando una variante polimorfa del FcγRIIIA que contiene una valina en la posición 158. El FcγRIIIA 158V muestra una mayor afinidad por la IgG1 que el 158F y un aumento en la actividad de ADCC (véase, por ejemplo, Koene *et al.*, 1997, *Blood*, 90: 1109-14; Wu *et al.*, 1997, *J. Clin. Invest.* 100: 1059-70); de hecho, este residuo interactúa directamente con la región de bisagra inferior de la IgG1, según se ha demostrado recientemente mediante estudios de cocrystalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, por ejemplo, Sonderman *et al.*, 2000, *Nature*, 100: 1059-70. Los estudios han demostrado que en algunos casos los anticuerpos terapéuticos tienen una eficacia mejorada en los pacientes homocigóticos para el FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 Rituximab era terapéuticamente más eficaz en los pacientes homocigóticos para el FcγRIIIA158V en comparación con los pacientes homocigóticos para el FcγRIIIA 158F (véase, por ejemplo, Cartron *et al.*, 2002 *Blood*, 99 (3): 754-8). En otras realizaciones, las moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigóticos para el FcγRIIIA-158V y el FcγRIIIA-158F y en pacientes con el FcγRIIA-131H. Aunque sin pretender estar ligados 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 en los diacuerpos terapéuticos, serán clínicamente más eficaces para los pacientes homocigóticos para dicho alotipo.

Se desarrolló un ensayo de unión al FcγR para determinar la unión de las moléculas de la invención al FcγR, y, en particular, para determinar la unión de los dominios Fc al FcγR. El ensayo permitía la detección y la cuantificación de las interacciones Fc-FcγR, a pesar de la inherente afinidad débil del receptor por su ligando, por ejemplo, en el intervalo micromolar para el FcγRIIB y el FcγRIIIA. El método se describe con detalle en la Solicitud Internacional WO04/063351 y en las Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos 005/0037000 y 2005/0064514. En resumen, el método implica la formación de un complejo del FcγR que puede usarse en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la materia, por ejemplo, una FACS, un ELISA, una resonancia de plasmón superficial, etc. Adicionalmente, el complejo del FcγR tiene una avidéz mejorada por una región Fc, con respecto a un FcγR no complejado. Según la invención, el complejo molecular preferido es un complejo inmunitario tetramérico, que comprende: (a) la región soluble del FcγR (por ejemplo, la región soluble del FcγRIIIA, del FcγRIIA o del FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG de 15 aminoácidos biotinilada (AVITAG) unida operativamente al C terminal de la región soluble del FcγR (por ejemplo, la región soluble del FcγRIIIA, del FcγRIIA o del FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); en una proporción molar para formar un complejo FcγR tetramérico (preferentemente en una proporción molar de 5:1). La proteína de fusión es biotinilada enzimáticamente usando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una ligasa de biotina que biotinila específicamente un residuo de lisina de la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR biotiniladas solubles se mezclan después con la SA-PE en una proporción molar de 1x de SA-PE:5x de FcγR biotinilado soluble para formar un complejo del FcγR tetramérico.

Se ha demostrado que los polipéptidos que comprenden las regiones Fc se unen a los complejos FcγR tetraméricos con una afinidad al menos 8 veces mayor que el FcγR monomérico no complejado. La unión de los polipéptidos que comprenden las regiones Fc a los complejos FcγR tetraméricos puede ser determinada usando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

También se describe el uso de los complejos inmunitarios que comprenden las moléculas de la invención y se forman según los métodos descritos anteriormente, para la determinación de la funcionalidad de las moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o exentos de células.

Por conveniencia, los reactivos pueden ser proporcionados en un kit de ensayo, es decir, una combinación envasada de reactivos para ensayar la capacidad de las moléculas que comprenden una regiones Fc para unirse a los complejos del FcγR tetraméricos. También se contemplan otras formas de complejos moleculares para su uso en la determinación de las interacciones Fc-FcγR para su uso en los métodos.

### Ensayos funcionales de moléculas con cadenas pesadas variantes

También se describe la caracterización de las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, dominios Fc (o porciones de los mismos) usando los ensayos conocidos por los expertos en la materia para la identificación de la función celular efectora de las moléculas. También se describe la caracterización de las moléculas de la invención para la función celular efectora mediada por el FcγR. Adicionalmente, cuando al menos uno de los antígenos objetivo de la molécula de diacuerpo de la invención es un FcγR, la unión del FcγR por parte de la molécula de diacuerpo puede servir para activar las rutas mediadas por el FcγR similares a las que son activadas por la unión 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 desencadenar una función celular efectora mediada por el FcγR sin que contenga un dominio Fc (o una porción del mismo), o sin la unión concomitante Fc-FcγR. Algunos ejemplos de funciones celulares efectoras que pueden ser ensayadas incluyen, pero no se limitan a, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la fagocitosis, la opsonización, la

opsonofagocitosis, la unión al C1q y la citotoxicidad celular dependiente del complemento. Puede usarse cualquier ensayo basado en células o exento de células conocido por los expertos en la materia para la determinación de la actividad de función celular efectora (para los ensayos de células efectoras, véase Perussia *et al.*, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Baggiolini *et al.*, 1998 *Experientia*, 44 (10): 841-8; Lehmann *et al.*, 2000 *J. Immunol. Methods*, 243 (1-2): 229-42; Brown E.J. 1994, *Methods Cell Biol.* 45: 147-64; Munn *et al.*, 1990 *J. Exp. Med.*, 172: 231-237, Abdul-Majid *et al.*, 2002 *Scand. J. Immunol.* 55: 70-81; Ding *et al.*, 1998, *Immunity* 8: 403-411).

En una realización, puede ensayarse la fagocitosis mediada por el FcγR en monocitos humanos de las moléculas de la invención. Alternativamente, la fagocitosis mediada por el FcγR de las moléculas de la invención puede ser ensayada en otros fagocitos, por ejemplo, en neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos humanos de sangre periférica, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse usando los procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Brown E.J. 1994, *Methods Cell Biol.* 45: 147-164). En una realización, la función de las moléculas de la invención se caracteriza mediante la medición de la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos sanguíneos de oveja (SRBC) opsonizados por la IgG fluorescentes mediante los métodos descritos previamente (Tridandapani *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 20480-7).

Otro ejemplo de ensayo para la determinación de la fagocitosis de las moléculas de la invención es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpo (ADCP) que puede comprender lo siguiente: el recubrimiento de una biopartícula objetivo tal como *Escherichia coli* marcada con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) un anticuerpo 4-4-20 natural, un anticuerpo contra la fluoresceína (véase Bedzyk *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.* 264 (3): 1565-1569), como el anticuerpo de control para la ADCP dependiente del FcγR; o (ii) un anticuerpo 4-4-20 portador de la mutación D265A que inactiva la unión al FcγRIII, como control de fondo para la ADCP dependiente del FcγR (iii) un diacuerpo que comprende el dominio de unión al epítipo de 4-4-20 y un dominio Fc y/o un dominio de unión al epítipo específico para el FcγRIII; y la formación de la partícula opsonizada; la adición de cualquiera de las partículas opsonizada (i-iii) a las células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible en la ATCC) en una proporción de 1:1, de 10:1, de 30:1, de 60:1, de 75:1 o de 100:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por el FcγR; preferentemente, la incubación de las células y de *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37 °C durante 1,5 horas; la adición de *trypan blue* después de la incubación (preferentemente a la temperatura ambiente durante 2-3 min) a las células para inactivar la fluorescencia de las bacterias que están adheridas al exterior de la superficie de la célula sin haber sido internalizadas; la transferencia de las células a un tampón de FACS (por ejemplo, BSA al 0,1 %, en PBS, azida de sodio al 0,1 %,), el análisis de la fluorescencia de las células THP1 usando una FACS (por ejemplo, BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 que se usan en el ensayo son analizadas mediante una FACS para evaluar la expresión del FcγR en la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto la CD32A como la CD64. La CD64 es un FcγR de alta afinidad que es bloqueado en la realización del ensayo de ADCP según los métodos del presente documento. Las células THP-1 se bloquean preferentemente con 100 µg/ml de IgG1 soluble o con suero humano al 10 %. Para analizar la magnitud de la ADCP, la clasificación se establece preferentemente en las células THP-1 y se mide la intensidad de la fluorescencia mediana. Se calcula la actividad de la ADCP para los mutantes individuales y se notifica en forma de un valor normalizado al chAcMc 4-4-20 natural obtenido. Las partículas opsonizadas son añadidas a las células THP-1 de tal forma que la proporción entre las partículas opsonizadas y las células THP-1 es de 30:1 o de 60:1. En las realizaciones más preferidas, el ensayo de ADCP se lleva a cabo con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que sirva como actividad de ADCP independiente del FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 natural (para que sirva como actividad de ADCP dependiente del FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (para que sirva como control de fondo para la actividad de ADCP dependiente del FcγR).

En otra realización, puede ensayarse la actividad de ADCC mediada por el FcγR de las moléculas de la invención en células efectoras, por ejemplo, en linfocitos citolíticos naturales, usando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Perussia *et al.*, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179-92; Weng *et al.*, 2003, *J. Clin. Oncol.* 21: 3940-3947; Ding *et al.*, *Immunity*, 1998, 8: 403-11). Un ejemplo de ensayo para la determinación de la actividad de ADCC de las moléculas de la invención se basa en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr que comprende: el marcaje de células individuales con [<sup>51</sup>Cr]Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (esta molécula permeable a la membrana celular se usa habitualmente para el marcaje dado que se une a las proteínas citoplasmáticas, y aunque es liberada espontáneamente desde las células con una cinética lenta, es liberada de forma masiva después de la necrosis de la célula objetivo); la opsonización de las células objetivo con las moléculas de la invención que comprenden cadenas pesadas variantes; la combinación de las células objetivo opsonizadas radiomarcadas con las células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción adecuada entre las células objetivo y las células efectoras; la incubación de la mezcla de células durante 16-18 horas a 37 °C; la recolección de los sobrenadantes; y el análisis de la radioactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la invención puede ser determinada, por ejemplo, usando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental - cpm filtrada del objetivo) / (cpm de la lisis con detergente - filtrada del objetivo) x 100 %. Alternativamente, % lisis = (ADCC-AICC) / (liberación máxima – liberación espontánea). La lisis específica puede calcularse usando la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la invención - % de lisis en ausencia de las moléculas de la invención. Puede generarse una gráfica modificando bien la proporción de objetivo:célula efectora o bien la concentración de anticuerpo.

Preferiblemente, las células efectoras usadas en los ensayos de ADCC son células mononucleares de sangre

- periférica (PBMC) que preferentemente se purifican a partir de sangre humana normal usando los métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, usando una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos del presente documento expresan diferentes receptores FcγR de activación. También se describen células efectoras, THP-1, que expresan el FcγRI, el FcγRIIA y el FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan tanto el FcγRIIIA como el FcγRIIB, para determinar si los mutantes de la cadena pesada del anticuerpo muestran un aumento de la actividad de ADCC y en la fagocitosis con respecto a los anticuerpos IgG1 naturales.
- La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis a través de la expresión del receptor de alta afinidad FcγRI y del receptor de baja afinidad FcγRIIA (Fleit et al., 1991, *J. Leuk. Biol.* 49: 556). Las células THP-1 no expresan constitutivamente el FcγRIIA ni el FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas efectúa el patrón de expresión del FcR (Pricop et al., 2000 *J. Immunol.* 166: 531-7). El cultivo de las células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión del FcγRIIB y provoca una reducción en la expresión del FcγRIIA y del FcγRI. La expresión del FcγRIIB también puede aumentarse incrementando la densidad celular (Tridandapani et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 5082-9). Por el contrario, se ha notificado que el IFNγ puede dar lugar a la expresión del FcγRIIIA (Pearse et al., 1993 *PNAS EE.UU.* 90: 4314-8). La presencia o la ausencia de receptores en la superficie celular puede ser determinada mediante una FACS usando los métodos habituales conocidos por un experto en la materia. La expresión inducida por citocinas del FcγR en la superficie celular proporciona un sistema para comprobar tanto la activación como la inhibición en presencia del FcγRIIB. Si las células THP-1 son incapaces de expresar el FcγRIIB, puede usarse otra línea celular monocítica humana, la U937. Se ha demostrado que estas células se diferencian a término en macrófagos en presencia de IFNγ y de TNF (Koren et al., 1979, *Nature* 279: 328-331).
- La destrucción de células tumorales dependiente del FcγR está mediada por los macrófagos y los linfocitos citolíticos naturales en modelos tumorales de ratón (Clynes et al., 1998, *PNAS EE.UU.* 95: 652-656). También se describe el uso de monocitos elutriados de donantes como células efectoras para analizar la eficiencia de los mutantes Fc para desencadenar la citotoxicidad celular de las células objetivo en ensayos tanto de fagocitosis como de ADCC. Los patrones de expresión del FcγRI, del FcγRIIIA y del FcγRIIB se ven afectados por las diferentes condiciones de cultivo. La expresión del FcγR a partir de monocitos elutriados congelados, de monocitos elutriados frescos, de monocitos mantenidos en un 10 % de FBS y de monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y o en suero humano puede ser determinada usando los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las células pueden teñirse con anticuerpos específicos del FcγR y analizarse mediante una FACS para determinar los perfiles del FcR. Las condiciones que mejor simulan la expresión del FcγR en los macrófagos *in vivo* se usan después para los métodos del presente documento.
- También se describe el uso de células de ratón, especialmente cuando no pueden obtenerse células humanas con los perfiles adecuados de FcγR. También se describe la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7 (ATCC) que puede ser transfectada con el FcγRIIIA humano, y aislarse los transfectantes estables usando los métodos conocidos en la materia, véase, por ejemplo, Ralph et al., *J. Immunol* 119: 950-4). Puede cuantificarse la expresión del FcγRIIIA de los transfectantes mediante un análisis de FACS usando la experimentación rutinaria y pueden usarse los expresores altos en los ensayos de ADCC descritos en el presente documento. También se describe el aislamiento de macrófagos peritoneales esplénicos que expresan el FcγR humano a partir de ratones transgénicos inactivados tales como los divulgados en el presente documento.
- Los linfocitos pueden ser recogidos a partir de donantes de sangre periférica (PBM) usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). En la población mononuclear aislada de células, la mayor parte de la actividad de ADCC se produce a través de los linfocitos citolíticos naturales (NK) que contienen el FcγRIIIA, pero no el FcγRIIB, en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes para desencadenar la ADCC de los NK y establecer los reactivos para la prueba con los monocitos elutriados.
- Algunas células objetivo usadas en los ensayos de ADCC incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de cáncer de mama, por ejemplo, SK-BR-3 con el número de registro de la ATCC HTB-30 (véase, por ejemplo, Tremp et al., 1976, *Cancer Res.* 33-41); linfocitos B; células derivadas de un linfoma de Burkitts, por ejemplo, células Raji con el número de registro de la ATCC CCL-86 (véase, por ejemplo, Epstein et al., 1965, *J. Natl. Cancer Inst.* 34: 231-240) y células Daudi con el número de registro de la ATCC CCL-213 (véase, por ejemplo, Klein et al., 1968, *Cancer Res.* 28: 1300-10). Las células objetivo deben ser reconocidas por el sitio de unión del antígeno de la molécula de diacuerpo que se va a ensayar.
- El ensayo de ADCC se basa en la capacidad de los linfocitos citolíticos naturales para mediar en la muerte celular a través de una ruta apoptótica. Los linfocitos citolíticos naturales median en la muerte celular en parte mediante el reconocimiento por parte del FcγRIIIA de un dominio Fc de una IgG unido a un antígeno en la superficie de una célula. Los ensayos de ADCC usados según los métodos del presente documento pueden ser ensayos con una base radioactiva o ensayos con una base fluorescente. El ensayo de ADCC usado para la caracterización de las moléculas de la invención que comprenden regiones Fc variantes comprende el marcaje de las células objetivo, por ejemplo, de células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, la opsonización de las células objetivo con un

5 anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular de la célula objetivo a través de su sitio de unión del antígeno; la combinación de las células objetivo marcadas opsonizadas y de las células efectoras en una proporción apropiada, que puede ser determinada mediante una experimentación rutinaria; la recolección de las células; la detección del marcador en el sobrenadante de las células objetivo lisadas, usando un esquema de detección apropiado basado en el marcador usado. Las células objetivo pueden ser marcadas bien con un marcado radioactivo o bien con un marcador fluorescente usando los métodos convencionales conocidos en la materia. Por ejemplo, algunos marcadores incluyen, pero no se limitan a, [<sup>51</sup>Cr]Na<sub>2</sub>CrCO<sub>4</sub>; y el acetoximetil éster del ligando mejorador de la fluorescencia 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA).

10 En una realización específica, se usa un ensayo fluorimétrico resuelto en el tiempo para la medición de la actividad de ADCC contra las células objetivo que han sido marcadas con el acetoximetil éster del ligando mejorador de la fluorescencia 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA). Dichos ensayos fluorimétricos son conocidos en la materia, por ejemplo, véase, Blomberg *et al.*, 1996, *Journal of Immunological Methods*, 193: 199-206. En resumen, se marcan las células objetivo con el acetoximetil diéster de TDA (bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato, (BATDA) permeable a la membrana, que difunde rápidamente a través de la membrana celular de las células viables. Las esterases intracelulares cortan los grupos éster y la molécula de TDA regenerada impermeable a la membrana es atrapada en el interior de la célula. Después de la incubación de las células efectoras y de las objetivo, por ejemplo, durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub>, el TDA liberado de las células objetivo lisadas es quelatado con Eu<sup>3+</sup> y la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica con un fluorímetro resuelto en el tiempo (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

25 En otra realización específica, el ensayo de ADCC usado para la caracterización de las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión del epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o una porción del mismo) comprenden las siguientes etapas: preferiblemente se marcan 4-5 x 10<sup>6</sup> células objetivo (por ejemplo, células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) con bis(acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallac). Para una eficiencia de marcaje óptima, el número total de células objetivo usado en el ensayo de ADCC preferentemente no debería exceder de 5 x 10<sup>6</sup>. Se añade el reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37 °C preferentemente con un 5 % de CO<sub>2</sub>, durante al menos 30 minutos. Después, las células se lavan con un tampón fisiológico, por ejemplo, PBS con sulfpirazol 0,125 mM y medio que contiene sulfpirazol 0,125 mM. Después, las células objetivo marcadas son opsonizadas (recubiertas) con una molécula de la invención que comprende un dominio de unión al epítipo específico para el FcγRIIA y, opcionalmente, un dominio Fc (o una porción del mismo). En las realizaciones preferidas, la molécula usada en el ensayo de ADCC también es específica para un receptor de la superficie celular, un antígeno tumoral o un oncoantígeno. La molécula de anticuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno de un cáncer o de un tumor, tales como los recogidos en la sección 5.6.1. Las células objetivo del ensayo de ADCC se eligen según los sitios de unión del epítipo modificados en el anticuerpo de la invención, de forma que el anticuerpo se une específicamente a un receptor de la superficie celular de la célula objetivo.

40 Las células objetivos son añadidas a las células efectoras, por ejemplo, a PBMC, para producir unas proporciones de efector:objetivo de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y las objetivo se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Se recogen los sobrenadantes celulares y se añaden a una solución ácida de europio (por ejemplo, la solución de europio DEFFIA, Perkin Elmer/Wallac). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados es cuantificada con un fluorímetro resuelto en el tiempo (por ejemplo, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan mediante la incubación de las células objetivo con un 1 % de TX-100 y con medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpo (AICC) se mide mediante la incubación de las células efectoras y las objetivo en ausencia de una molécula de prueba, por ejemplo, un anticuerpo de la invención. Cada ensayo se lleva a cabo preferentemente por triplicado. La lisis específica porcentual media se calcula como: liberación experimental (ADCC) - AICC / (MR-SR) x 100.

50 También se describe el uso de los ensayos conocidos en la materia y ejemplificados en el presente documento para la caracterización de la unión del C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por parte de las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc (o porciones de los mismos). Para determinar la unión del C1q puede llevarse a cabo un ELISA del C1q. Un ejemplo de ensayo puede comprender el siguiente: pueden recubrirse placas de ensayo durante una noche a 4°C con un polipéptido que comprende una molécula de la invención o un polipéptido de partida (control) en tampón de recubrimiento. Después, las placas pueden lavarse y bloquearse. Después del lavado puede añadirse una alícuota del C1q humano a cada pocillo e incubarse durante 2 h a la temperatura ambiente. Después de un lavado adicional pueden añadirse 100 µl de un anticuerpo de oveja anti-C1q del complemento conjugado con peroxidasa a cada pocillo e incubarse durante 1 hora a la temperatura ambiente. La placa puede lavarse de nuevo con tampón de lavado y pueden añadirse 100 µl del tampón del sustrato que contiene OPD (diclorhidrato de O-fenilenodiamina (Sigma)) a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse proceder durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,5 N. Después puede leerse la absorbancia a (492-405) nm.

65 Para evaluar la activación del complemento puede llevarse a cabo un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, según se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163

(1996). En resumen, pueden diluirse varias concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o una porción del mismo) y complemento humano con tampón. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml. Pueden añadirse las mezclas de las moléculas de diacuerpos que comprenden un dominio Fc (variante) (o una porción del mismo), el complemento humano diluido, y las células que expresan el antígeno a una placa de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos y dejarse en incubación durante 2 h a 37C y un 5 % de CO<sub>2</sub> para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Después, pueden añadirse 50 µl de alamar blue (Accumed International) a cada pocillo e incubarse durante una noche a 37 C. La observancia se mide usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden ser expresados en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Las concentraciones de la muestra pueden ser computadas a partir de una curva patrón, y se notifica la actividad porcentual en comparación con una molécula no variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc no variante, para la variante de interés.

### Otros ensayos

Las moléculas de la invención que comprenden múltiples dominio de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc, pueden ensayarse usando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón superficial conocido en la materia para la caracterización de los parámetros genéticos de la unión antígeno-dominio de unión o Fc-FcγR. Puede usarse cualquier instrumento de SPR disponible comercialmente incluyendo, pero no se limita a, BIAcore Instruments, disponible en Biacore AB (Uppsala, Suecia); IAsys instruments disponible en Affinity Sensors (Franklin, MA.); el sistema IBIS disponible en Windsor Scientific Limited (Berks, Reino Unido), los sistemas SPR-CELLIA disponibles en Nippon Laser y en Electronics Lab (Hokkaido, Japón), y el SPR Detector Spreeta disponible en Texas Instruments (Dallas, TX). Para una revisión de la tecnología basada en la SPR véase Mullet *et al.*, 2000, *Methods* 22: 77-91; Dong *et al.*, 2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303-23; Fivash *et al.*, 1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97-101; Rich *et al.*, 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11: 54-61. Adicionalmente, en los métodos se contemplan cualquiera de los instrumentos de SPR y de los métodos basados en la SPR para la medición de las interacciones proteína-proteína descritos en las Patente de Estados Unidos n° 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125.

En resumen, los ensayos basados en la SPR implican la inmovilización de un miembro de un par de unión en una superficie y la monitorización de su interacción con el otro miembro del par de unión en solución en tiempo real. La SPR se basa en la medición del cambio en el índice de refracción del disolvente cerca de la superficie que se produce tras la formación o la disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es el corazón de la tecnología de SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base de un abanico de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. En el mercado hay disponibles una diversidad de chips sensores, especialmente en las compañías indicadas *supra*, todos los cuales pueden usarse en los métodos del presente documento. Algunos ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles en BIAcore AB, Inc., por ejemplo, Sensor Chip CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la invención puede ser inmovilizada en la superficie de un chip sensor usando cualquiera de los métodos y las químicas de inmovilización conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, un acoplamiento covalente directo a través de grupos amino, un acoplamiento covalente directo a través de grupos sulfhidrilo, la unión de biotina a una superficie recubierta con avidina, el acoplamiento de un aldehído a grupos carbohidrato y la unión a través de la etiqueta de histidina con chips NTA.

En algunas realizaciones, los parámetros cinéticos de la unión de las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión del epítipo y, opcionalmente y dominio Fc, a un antígeno o un FcγR, pueden ser determinados usando un instrumento BIAcore (por ejemplo, un instrumento BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Como se ha analizado *supra*, véase la sección 5.4.1, puede usarse cualquier FcγR para evaluar la unión de las moléculas de la invención tanto cuando al menos un sitio de unión del epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce inmuno-específicamente un FcγR, y/o como cuando la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o una porción del mismo). En una realización específica, el FcγR es el FcγRIIIA, preferentemente un FcγRIIIA soluble monomérico. Por ejemplo, en una realización, el FcγRIIIA soluble monomérico es la región extracelular del FcγRIIIA unida a la secuencia conectora AVITAG). En otra realización específica, el FcγR es el FcγRIIB, preferentemente un FcγRIIB soluble dimérico.

Para todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento/unión al FcγR por parte de una molécula de la invención puede ser efectuado mediante múltiples dominios: en ciertas realizaciones, las moléculas de la invención reconocen inmuno-específicamente un FcγR a través de uno de los múltiples dominios de unión al epítipo; en otras realizaciones más, cuando la molécula de la invención comprende un dominio Fc (o una porción del mismo), la molécula de diacuerpo puede reconocer inmuno-específicamente un FcγR a través de las interacciones Fc-FcγR; en otras realizaciones adicionales más, cuando una molécula de la invención comprende tanto un dominio Fc (o una porción del mismo) como un sitio de unión del epítipo que reconoce inmuno-específicamente un FcγR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcγR a través de uno o de ambos de un dominio de unión al epítipo y del dominio Fc (o una porción del mismo). Un ejemplo de ensayo para la determinación de los parámetros cinéticos de una molécula que comprende múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente y dominio Fc (o una porción del mismo) a un antígeno y/o a un FcγR usando un instrumento BIAcore comprende lo siguiente: se inmoviliza un primer

antígeno en una de las cuatro celdas de flujo de la superficie de un chip sensor, preferentemente a través de una química de acoplamiento de amina, de tal forma que se inmovilicen aproximadamente 5.000 unidades de respuesta (UR) de dicho primer antígeno en la superficie. Una vez se ha preparado la superficie adecuada, las moléculas de la invención que reconocen inmunoespecíficamente dicho primer antígeno se hacen pasar a través de la superficie, preferentemente mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 µg/ml a un caudal de 5 µl/ml. Los niveles de las moléculas de la invención unidas a la superficie en esta fase normalmente varían entre 400 y 700 UR. Después, se inyectan unas series de diluciones de un segundo antígeno (por ejemplo, un FcγR) o de un receptor FcγR en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, a un pH de 7,5) en la superficie a 100 µl/min. La regeneración de las moléculas entre las diferentes diluciones del segundo antígeno o del receptor se lleva a cabo preferentemente mediante inyecciones individuales de 5 segundos de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM a un pH de 9,4; NaCl 3 M. Se contempla cualquier técnica de regeneración conocida en la materia en el método del presente documento.

Una vez recogida la totalidad del conjunto de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente usando los algoritmos informáticos suministrados por el fabricante del instrumento SPR, por ejemplo, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la  $K_{on}$  como la  $K_{off}$ , a partir de las cuales se deduce la constante de unión en equilibrio aparente,  $K_d$ , como la proporción entre las dos constantes de velocidad (es decir,  $K_{off}/K_{on}$ ). Pueden encontrarse más tratamientos detallados de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales en el BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). El análisis de los datos generados puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la materia. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados, véase Myszka, 1997, *Current Opinion in Biotechnology* 8: 50-7; Fisher *et al.*, 1994, *Current Opinion in Biotechnology* 5: 389-95; O'Shannessy, 1994, *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 65-71; Chaiken *et al.*, 1992, *Analytical Biochemistry*, 201: 197-210; Morton *et al.*, 1995, *Analytical Biochemistry* 227: 176-85; O'Shannessy *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry* 236: 275-83.

En algunas realizaciones preferidas pueden usarse los parámetros cinéticos determinados mediante el uso de un análisis de SPR, por ejemplo, BIAcore, como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula de la invención en un ensayo funcional, por ejemplo, una ADCC. Un ejemplo de método para la predicción de la eficacia de una molécula de la invención basado en los parámetros cinéticos obtenidos a partir de un análisis de SPR puede comprender lo siguiente: la determinación de los valores de la  $K_{off}$  para la unión de una molécula de la invención al FcγRIIIA y al FcγRIIB (a través de un dominio de unión al epítipo y/o de un dominio Fc (o de una porción del mismo)); la representación gráfica de (1)  $K_{off}(\text{nat})/K_{off}(\text{mut})$  para el FcγRIIIA; (2)  $K_{off}(\text{mut})/K_{off}(\text{nat})$  para el FcγRIIB frente a los datos de la ADCC. Las cifras mayores de uno muestran una disminución en la velocidad de disociación para el FcγRIIIA y un aumento en la velocidad de disociación para el FcγRIIB con respecto al natural; y posee y función de ADCC mejorada.

#### **Métodos para la producción de las moléculas de diacuerpos de la invención**

Las moléculas de diacuerpos de la presente invención pueden ser producidas usando una diversidad de métodos bien conocidos en la materia, incluyendo la síntesis de proteínas *de novo* y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácidos nucleicos deseadas pueden ser producidas mediante métodos recombinantes (por ejemplo, mutagénesis mediante una PCR de una variante preparada previamente del polinucleótido deseado) o mediante una síntesis de ADN en fase sólida. Habitualmente se usan métodos de expresión recombinante. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o un VL de una CD16A. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un VH y/o un VL de una CD32B. Debido a la degeneración del código genético, diversas secuencias de ácidos nucleicos codifican cada secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina, y la presente invención incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

#### **Polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención**

La presente invención también incluye una molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 24 del presente documento. Los polinucleótidos que codifican las moléculas de la invención pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, mediante cualquier método conocido en la materia.

Una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos de las moléculas mediante los métodos del presente documento, la secuencia de nucleótidos puede ser manipulada usando métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel *et al.*, eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, NY), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo, mediante la generación de sustituciones, de deleciones y/o de inserciones de aminoácidos.

En una realización, pueden cribarse colecciones humanas o cualquier otra colección disponible en la materia, mediante las técnicas convencionales conocidas en la materia, para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la invención.

**Expresión recombinante de las moléculas de la invención**

Una vez se ha obtenido una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las moléculas de la invención (es decir, los anticuerpos), puede producirse el vector para la producción de las moléculas mediante la tecnología del ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para la construcción de los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes de las moléculas de la invención y las apropiadas señales de control de la transcripción y de la traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y la recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1990, Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y en Ausubel *et al.* eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, NY).

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

Las células hospedadoras usadas 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 una molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor génico temprano intermedio del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas (Foelking *et al.*, 1998, *Gene* 45: 101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8: 2).

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para la expresión de las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento. Dichos sistemas de hospedador-expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de las moléculas de la invención y purificarse posteriormente, pero también representan las células que, cuando son transformadas o transfectadas con las apropiadas secuencias codificantes de nucleótidos, pueden expresar las moléculas del presente documento *in situ*. Éstas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinantes de levadura que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células de insecto o infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV) o vectores de expresión transformados con plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfocíticas (véase el documento U.S. 5.807.715), células Per C.6 (células de la retina humanas desarrolladas por Crucell) portadoras de construcciones de expresión recombinantes que contienen los promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor del virus de la variolovacuna 7.5K).

En los sistemas bacterianos puede seleccionarse ventajosamente una diversidad de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de elevados niveles de los productos de la proteína de fusión que sean fácilmente purificables. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2: 1791), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ser ligada individualmente en el vector en marco con la región codificante de *lac Z*, de forma que se produzca una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109; VanHeeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509); y similares. También pueden usarse los vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos en forma de proteínas de fusión con la S-transferasa de glutatión (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas mediante una adsorción y la unión a una matriz de microesferas de glutatión-agarosa, seguido de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir los sitios de escisión de la trombina o de la proteasa del factor Xa, de forma que el producto genérico objetivo clonado pueda ser liberado desde la fracción de la GST.

En un sistema de insectos se usa el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como vector para la expresión de los genes foráneos. El virus crece en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede ser clonada individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la



polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor del AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

5 En las células hospedadoras de mamífero puede utilizarse una diversidad de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se use un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede ser insertado después en el genoma del adenovirus mediante una recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en los hospedadores infectados (véase, por ejemplo, Logan & Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 355-359). También pueden requerirse unas señales de inicio específicas para una traducción eficiente de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en fase con el marco lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de la totalidad del inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y los codones de inicio pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de los apropiados elementos mejoradores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. (véase, Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 51-544).

20 Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, una glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de diacuerpo de la invención pueden ser expresados en forma de un producto génico individual (por ejemplo, en forma de una cadena polipeptídica única, es decir, en forma de un precursor de poliproteína), lo que requiere una escisión proteolítica por parte de los mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar los polipéptidos individuales de las moléculas de diacuerpos de la invención. También se describe la modificación de una secuencia de ácidos nucleicos para codificar una molécula precursora de poliproteína que comprende los polipéptidos del diacuerpo de la invención, que incluye unas secuencias codificantes capaces de dirigir la escisión post-traduccional de dicho precursor poliproteico. La escisión post-traduccional del precursor poliproteico da como resultado los polipéptidos del diacuerpo de la invención. La escisión post-traduccional de la molécula precursora que comprende los polipéptidos del diacuerpo de la invención puede producirse *in vivo* (es decir, en la célula hospedadora por parte de los sistemas/mecanismos celulares nativos o recombinantes, por ejemplo, una 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 con una actividad conocida y/o en una composición que comprende unas condiciones o unos reactivos conocidos por fomentar la acción proteolítica deseada). La purificación y la modificación de las proteínas recombinantes son bien conocidas en la materia, de forma que el diseño del precursor poliproteico podría incluir una diversidad de realizaciones fácilmente reconocidas por un trabajador experto. Puede usarse cualquier proteasa o peptidasa conocida en la materia para la modificación descrita de la molécula precursora, por ejemplo, la trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR<sup>^</sup>GS (la SEQ ID NO: 91)) o el factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR<sup>^</sup> (la SEQ ID NO: 92) (Nagani *et al.*, 1985, *PNAS EE.UU.* 82: 7252-7255 y revisada en Jenny *et al.*, 2003, *Protein Expr. Purif.* 31: 1-11)), la enterocinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK<sup>^</sup> (la SEQ ID NO: 93) (Collins-Racie *et al.*, 1995, *Biotechnol.* 1. 13: 982-987)), la furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR<sup>^</sup>, con preferencia por la RX(K/R)R<sup>^</sup> (la SEQ ID NO: 94 y la SEQ ID NO: 95, respectivamente) (aparece una R adicional en la posición P6 para mejorar la escisión)) y la AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ<sup>^</sup>G (la SEQ ID NO: 96) (Parks *et al.*, 1994, *Anal. Biochem.* 216: 413)) y la proteasa C3 del virus de la glosopeda. Véase, por ejemplo, la sección 6.4, *supra*.

50 Las diferentes células hospedadoras tienen unos mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traduccional y la modificación de las proteínas y de los productos génicos. Pueden elegirse las apropiadas líneas celulares con sistemas hospedadores para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada. A este respecto, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

60 Para una producción a largo plazo de alto rendimiento de las proteínas recombinantes se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse líneas celulares que expresen de forma estable un anticuerpo en lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células hospedadoras pueden ser transformadas con un ADN controlado por los apropiados elementos de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, un potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, las células modificadas pueden dejarse en crecimiento durante 1-2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden ser clonados y expandidos en

líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresen los anticuerpos del presente documento. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la invención.

5 Pueden usarse diversos sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, la cinasa de timidina del virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977, *Cell* 11: 223), la fosforribosiltransferasa de hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 48: 202) y la fosforribosiltransferasa de adenina (Lowy *et al.*, 1980, *Cell* 22: 817) los genes pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También puede  
10 usarse una resistencia antimetabolito como la base de la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 357; O'Hare *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:  
15 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; mayo de 1993, *TIB TECH* 11 (5): 155-215). Los métodos conocidos habitualmente en la materia de la tecnología del ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al* (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual. Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al* (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.*,  
20 1981, *J. Mol Biol* 150: 1; e hgro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, 1984, *Gene* 30: 147).

Los niveles de expresión de una molécula de la invención pueden aumentarse mediante una amplificación con un vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning. Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando  
25 un marcador del sistema de vector 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, *Mol Cell Biol* 3: 257).

30 La célula hospedadora puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo y el segundo vector que codifica el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener unos marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igualitaria de ambos polipéptidos. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes de los polipéptidos de las moléculas de la invención  
35 pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que se ha expresado recombinantemente una molécula de la invención (es decir, los diacuerpos), puede ser purificada mediante cualquier método conocido en la materia para la purificación de polipéptidos, de poliproteínas o de diacuerpos (por ejemplo, unos esquemas análogos a la purificación de anticuerpos basándose en  
40 la selectividad del antígeno), por ejemplo, mediante una cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente mediante la afinidad por el antígeno específico (opcionalmente después de una selección con Proteína A en la que la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o una porción del mismo)) y una cromatografía en columna por tamaños), una centrifugación, una solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos, de poliproteínas o de diacuerpos.

#### 45 **Métodos profilácticos y terapéuticos**

Las moléculas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, de un trastorno o de una infección en los que se desea una función celular efectora (por ejemplo, la ADCC) mediada  
50 por el FcγR (por ejemplo, un cáncer, una enfermedad infecciosa). Como se ha analizado *supra*, los diacuerpos de la invención pueden mostrar una funcionalidad de tipo anticuerpo para desencadenar una función efectora aunque la molécula de diacuerpo no comprenda y dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión al epítipo que reconoce inmunoespecíficamente un FcγR, la molécula de diacuerpo puede mostrar una unión al FcγR y una actividad análoga a las interacciones Fc-FcγR. Por ejemplo, las moléculas de la invención pueden unirse a un  
55 antígeno de la superficie celular y a un FcγR (por ejemplo, un FcγRIIIA) de una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, un linfocito citolítico natural), 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 una porción del mismo). En dichas realizaciones, el dominio Fc puede comprender adicionalmente al menos una modificación de  
60 aminoácido con respecto a un dominio Fc natural (o una porción del mismo) y/o puede comprender los dominios de uno o más isotipos de la IgG (por ejemplo, de la IgG1, de la IgG2, de la IgG3 o de la IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden mostrar unos fenotipos conferidos o alterados con respecto a las moléculas que comprenden el dominio Fc natural, tal como una actividad de función efectora alterada o conferida (por ejemplo, según se ensaya en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos). En dichas realizaciones, las moléculas de la invención con una actividad de función efectora conferida o alterada son  
65

útiles para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, de un trastorno o de una infección en los que se desea un aumento en la eficacia de la función efectora. En ciertas realizaciones, las moléculas de diacuerpos de la invención que comprenden un dominio Fc (o una porción del mismo) median en la cascada dependiente del complemento. Los dominios Fc variantes identificados por alterar función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 2005/0037000 y 2005/0064514 y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos 11/271.140 (Publicación nº: US 2006-0134709 A1), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación nº US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Inventores.

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento, la prevención o la atención de un cáncer en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios de unión del epítipo y opcionalmente, un dominio Fc (o una porción del mismo) modificado según la descripción del presente documento, molécula que se une adicionalmente a un oncoantígeno. Las moléculas de la invención son particularmente útiles para la prevención, la inhibición, la reducción del crecimiento o la regresión de tumores primarios, de metástasis de células cancerosas y de enfermedades infecciosas. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de la invención median en la función efectora, lo que da como resultado la eliminación del tumor, la reducción del tumor o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones alternativas, los diacuerpos de la invención median en la actividad terapéutica mediante la reticulación de los antígenos y/o de los receptores de la superficie celular, y en una mejora de la apoptosis o una señalización reguladora del crecimiento negativo.

Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, las moléculas de diacuerpos de la invención muestran una eficacia terapéutica mejorada con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la materia, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo para unirse inmunoespecíficamente a una célula objetivo que expresa un antígeno en particular (por ejemplo, el FcγR) a unos niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del anticuerpo para permanecer sobre la célula objetivo más tiempo debido a una avidéz mejorada de la interacción diacuerpo-epítipo.

Los diacuerpos de la invención con una afinidad y una avidéz mejoradas por los antígenos (por ejemplo, los FcγR) son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención o la atención de un cáncer, o de otra enfermedad o trastorno, en un sujeto, en el que los FcγR son expresados a bajos niveles en las poblaciones de células objetivo. Según se usa en el presente documento, la expresión del FcγR en las células se define en términos de la densidad de dichas moléculas por célula según se mide mediante el uso de los métodos habituales conocidos por los expertos en la materia. Las moléculas de la invención que comprenden múltiples sitios de unión del epítipo y, opcionalmente y FcγR (o una porción del mismo) preferentemente tienen también una avidéz y una afinidad y/o una función efectora conferidas o aumentadas en las células que expresan un antígeno objetivo, por ejemplo, un oncoantígeno, a una densidad de entre 30.000 y 20.000 moléculas/célula, a una densidad de entre 20.000 y 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o menos, a una densidad de 5000 moléculas/célula o menos, o a una densidad de 1.000 moléculas/célula o menos. Las moléculas de la invención tienen utilidad en particular en el tratamiento, la prevención o la atención de una enfermedad o de un trastorno, tal como un cáncer, en una subpoblación, en la que el antígeno objetivo es expresado a unos bajos niveles en la población de células objetivo.

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

## **Cánceres**

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo. También se describen métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto con polimorfismos FcγR, tales como aquellos homocigóticos para los alelos FcγRIIIA-158V o FcγRIIIA-158F. También se describe la modificación de al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para que se una inmunoespecíficamente al FcγRIIIA (158F). También se describe la modificación de al menos un dominio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo para que se una inmunoespecíficamente al FcγRIIIA (158V).

La eficacia de la terapia con un anticuerpo monoclonal convencional depende del polimorfismo FcγR del sujeto

(Carton *et al.*, 2002 *Blood*, 99: 754-8; Weng *et al.*, 2003 *J Clin Oncol* .21 (21): 3940-7). Estos receptores son expresados en la superficie de las células efectoras y median en la ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores de activación de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar en la ADCC. Al contrario que los que se basan en las interacciones Fc-FcγR para efectuar la función efectora, los métodos del presente documento engloban la modificación de moléculas para que reconozcan inmunespecíficamente los receptores de activación de baja actividad, permitiendo que las moléculas estén diseñadas para un polimorfismo específico. Alternativa o adicionalmente, la molécula de la invención puede ser modificada para que comprenda un dominio Fc variante que muestren un aumento en la afinidad por el FcγR (con respecto a un dominio Fc natural) en las células efectoras. Las moléculas de la invención modificadas proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para pacientes independientemente de su polimorfismo FcγR.

Las moléculas de diacuerpos modificadas según la descripción del presente documento se prueban mediante una ADCC usando bien una línea celular cultivada o bien células PMBC derivadas de un paciente, para determinar la capacidad de las mutaciones del Fc para mejorar la ADCC. La ADCC convencional se lleva a cabo usando los métodos divulgados en el presente documento. Se recogen linfocitos de sangre periférica usando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células objetivo, es decir, las líneas celulares cultivadas por las células derivadas de un paciente, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con los efectores durante 4 h a 37 °C. El europio liberado se detecta usando un lector de placas fluorescentes (Wallac). Los datos resultantes de la ADCC indican la eficacia de las moléculas de la invención para desencadenar una citotoxicidad celular mediada por los linfocitos citolíticos naturales y establecer qué moléculas pueden ser probadas con ambas muestras de pacientes y de monocitos elutriados. Las moléculas de diacuerpos que muestran el mayor potencial para desencadenar una actividad de ADCC se prueban después en un ensayo de ADCC usando las PMBC de pacientes. Se usan PMBC de donantes sanos como las células efectoras.

También se describen métodos para la prevención o el tratamiento de un cáncer caracterizado por un oncoantígeno mediante la modificación de la molécula de diacuerpo para que reconozca inmunespecíficamente dicho oncoantígeno, de forma que la propia molécula de diacuerpo sea citotóxica (por ejemplo, a través de la reticulación de los receptores de la superficie que da lugar a un aumento en la apoptosis, o a una regulación por disminución de las señales proliferativas) y/o que comprenda un dominio Fc, y/o que medie en una o más funciones efectoras (por ejemplo, la ADCC, la fagocitosis). Los diacuerpos que han sido modificados según la descripción del presente documento son útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer, dado que tienen una actividad citotóxica (por ejemplo, un aumento en la destrucción de las células tumorales y/o un aumento, por ejemplo, en la actividad de ADCC o en la actividad de CDC).

Los cánceres asociados con un oncoantígeno pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se une al oncoantígeno y que es citotóxico, y/o que ha sido modificado según los métodos del presente documento para que muestre una función efectora. Por ejemplo, pero en modo alguno como limitación, los cánceres asociados con los siguientes oncoantígenos pueden ser tratados o prevenidos mediante los métodos y las composiciones del presente documento: el antígeno KS del pan-carcinoma 1/4 (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 32-37; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7 (4): 407-415), el antígeno del carcinoma ovárico (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51 (2): 48-475), el fosfato ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18 (1): 4928), el antígeno específico prostático (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10 (2): 903-910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230), el antígeno asociado al melanoma p97 (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81 (6): 445-44), el antígeno del melanoma gp75 (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* 171 (4): 1375-1380), el antígeno del melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer* 59: 55-3; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), el antígeno de membrana específico prostático, el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), el antígeno mucínico epitelial polimorfo, el antígeno del glóbulo de grasa láctea humana, los antígenos asociados a tumores colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 3402-3408), el C017-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751-758); el GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), el CTA-1 y el LEA, el antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, el CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1329-1336), el antígeno del linfoma B humano CD20 (Reff *et al.*, 1994, *Blood* 83: 435-445), el CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422-430), los antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 151, 3390-3398), el gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373-380), el gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036-1044), el gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 5244-5250), el antígeno de la superficie celular tumoral específico del tipo de trasplante (TSTA) tales como los antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo antígenos T de virus tumorales de ADN y antígenos de la cubierta de virus tumorales de ARN, el antígeno de la alfa-fetoproteína oncofetal tal como el CEA de colon, el antígeno tumoral de vejiga oncofetal (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45: 2210-2188), los antígenos de diferenciación tales como el antígeno del carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46: 3917-3923), los antígenos de fibrosarcoma, el antígeno de la leucemia de linfocitos T humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. of Immun.* 141: 1398-1403), la neoglicoproteína, los esfingolípidos, el antígeno del cáncer de mama tal como el EGFR (el receptor del factor de crecimiento epidérmico), el antígeno HER2 (p185<sup>HER2</sup>), la mucina epitelial polimorfa (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), el antígeno de linfocitos humano maligno APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, *Science* 245: 301-304), el antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales y el endodermo primario, el I (Ma) que se encuentra

5 en adenocarcinomas gástricos, el M18 y el M39 que se encuentran en el epitelio mamario, el SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, el VEP8, el VEP9, el Milo, el VIM-D5 y el D<sub>156-22</sub> que se encuentran en el cáncer colorrectal, el TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), el C14 que se encuentra en el adenocarcinoma de colon, el F3 que se encuentra en el adenocarcinoma de pulmón, el AH6 que se encuentra en el cáncer gástrico, el hapteno Y, el Le<sup>y</sup> que se encuentran en las células de carcinoma embrionarias, el TL5 (grupo sanguíneo A), el receptor EGF que se encuentra en las células A431, la serie E<sub>1</sub> (grupo sanguíneo B) que se encuentra en el cáncer de páncreas, el FC10.2 que se encuentra en las células de carcinoma embrionarias, de adenocarcinoma gástrico, el CO-514 (grupo sanguíneo Le<sup>a</sup>) que se encuentra en el adenocarcinoma, el NS-10 que se encuentra en adenocarcinomas, el CO-43 (grupo sanguíneo Le<sup>b</sup>), el G49, el receptor EGF, (grupo sanguíneo ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>) que se encuentra en el adenocarcinoma de colon, el 19.9 que se encuentra en el cáncer de colon, las mucinas del cáncer gástrico, el T<sub>5A7</sub> que se encuentra en las células mieloides, el R24 que se encuentra en melanoma, el 4.2, el G<sub>D3</sub>, el D1.1, el OFA-1, el Gm2, el OFA-2, el Gd2, el M1:22:25:8 que se encuentran en las células de carcinoma embrionarias, y el SSEA-3, el SSEA-4 que se encuentra en embriones en la fase de 4-8 células. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de los linfocitos T de un linfoma cutáneo de linfocitos T (véase, Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4: 62).

Algunos cánceres y trastornos relacionados que pueden ser tratados o prevenidos mediante los métodos y las composiciones del presente documento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: leucemias que incluyen, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, leucemias eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero no se limitan a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia; policitemia vera; linfomas tales como, pero no se limitan a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no se limitan a, mieloma múltiple quiescente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia plasmocítica, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammopatía monoclonal de significación indeterminada; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas del tejido óseo y conectivo tales como, pero no se limitan a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma periosteal, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales que incluyen, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (microcítico), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Pages y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal, que incluye, pero no se limita a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no se limita a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, que incluye, pero no se limita a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de las células de los islotes; cánceres de la pituitaria que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares que incluyen, pero no se limitan a, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma de la coroides y melanoma del cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres de vagina que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva que incluye, pero no se limita a, carcinoma epidermoide, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma; cánceres de útero que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma endometrial y sarcoma de útero; cánceres de ovario que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma epitelial de ovario, tumor intermedio, tumor de las células germinales y tumor estromal; cánceres de esófago que incluyen, pero no se limitan a, cáncer epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoepidermoide, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso y carcinoma indiferenciado (microcítico); cánceres de estómago que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, neoplásico (polipoide), ulcerativo, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de la vesícula biliar que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen, pero no se limitan a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma epidermoide (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón microcítico; cánceres testiculares que incluyen, pero no se limitan a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, leiomiomas y rhabdomyosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma epidermoide; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivares que incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoquístico; cánceres de faringe que incluyen, pero no se limitan a, cáncer epidermoide y verrucoso; cánceres de piel que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (de la pelvis renal y/o del úterer); tumor de Wilms; cánceres de vejiga que incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células

transicionales, cáncer epidermoide, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, algunos cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangoendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, y Murphy *et al.*, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books EE.UU., Inc., Estados Unidos América).

Consecuentemente, los métodos y las composiciones del presente documento también son útiles en el tratamiento o la prevención de una diversidad de cánceres o de otras enfermedades proliferativas anormales que incluyen, (pero no se limitan a) las siguientes: carcinoma, que incluyen, de vejiga, de mama, de colon, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de estómago, de próstata, de cuello de útero, de tiroides y de piel; que incluyen, carcinoma epidermoide; tumores hematopoyéticos de la estirpe linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burketts; tumores hematopoyéticos de la estirpe mielóide que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso que incluyen fibrosarcoma y rabiomiosarcoma; otros tumores, que incluyen, melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso que incluyen fibrosarcoma, rabiomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen, melanoma, xenoderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. También se contempla que los cánceres causados por aberraciones en la apoptosis puedan ser tratados también mediante los métodos y las composiciones del presente documento. Dichos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en el p53, tumores de mama hormonodependientes, lesiones precancerosas de próstata y de ovario tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En algunas realizaciones específicas, los cambios malignos o disproliferativos (tales como las metaplasias y las displasias) o los trastornos hiperproliferativos se tratan o se previenen mediante los métodos y las composiciones del presente documento en el ovario, la vejiga, la mama, el colon, el pulmón, la piel, el páncreas o el útero. En otras realizaciones específicas se trata o se previene el sarcoma, el melanoma o la leucemia mediante los métodos y las composiciones del presente documento.

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

En una realización específica, una molécula de la invención (por ejemplo, un diacuerpo que comprende múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente y dominio Fc (o una porción del mismo)) destruye las células o inhibe o reduce el crecimiento de las células cancerosas 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 parental.

#### 45 **Enfermedad autoinmune y enfermedades inflamatorias**

En algunas realizaciones, las moléculas de la invención comprenden un dominio de unión al epítipo específico para el Fc $\gamma$ RIIB y o/ un dominio Fc variante (o una porción del mismo), modificado según los métodos del presente documento, dominio Fc que muestra una mayor afinidad por el Fc $\gamma$ RIIB y una afinidad disminuida por el Fc $\gamma$ RIIA y/o por el Fc $\gamma$ RIIA con respecto a un dominio Fc natural. Las moléculas de la invención con dichas características de unión son útiles en la regulación de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la inhibición de la respuesta inmunitaria en relación con enfermedades autoinmunes o con enfermedades inflamatorias. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la invención con una afinidad por el Fc $\gamma$ RIIB y/o que comprenden un dominio Fc con una afinidad aumentada por el Fc $\gamma$ RIIB y una afinidad disminuida por el Fc $\gamma$ RIIA y/o Fc $\gamma$ RIIA pueden dar lugar a una amortiguación en la respuesta de activación del Fc $\gamma$ R y a una inhibición en la sensibilidad celular, y por lo tanto, tienen eficacia terapéutica para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno autoinmune.

También se describen métodos para la prevención, el tratamiento o la atención de uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprenden adicionalmente la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen métodos para la prevención, el tratamiento o la atención de uno o más síntomas asociados con una enfermedad autoinmune que comprenden adicionalmente la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La Sección 5.7 proporciona algunos ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y de agentes inmunomoduladores.

Algunos ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden ser tratados mediante la administración de las moléculas

de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide vesicular, cardiomiopatía, dermatitis herpetiforme, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes sacarina de tipo 1 o inmunitaria, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis, vasculitis herpetiforme, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Algunos ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones crónicas víricas o bacterianas. Según se describe en el presente documento en la Sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunes están asociados con una afección inflamatoria. Por lo tanto, hay un solapamiento entre lo que se considera un trastorno autoinmune y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunes también pueden ser caracterizados como trastornos inflamatorios. Algunos ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o atenderse según los métodos del presente documento incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía no diferenciada, artropatía no diferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones crónicas víricas o bacterianas.

Las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico para el FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una afinidad aumentada por el FcγRIIB y una afinidad disminuida por el FcγRIIIA también pueden usarse para reducir la inflamación experimentada por 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 %, en al menos un 95 %, en al menos un 90 %, en al menos un 85 %, en al menos un 80 %, en al menos un 75 %, en al menos un 70 %, en al menos un 60 %, en al menos un 50 %, en al menos un 45 %, en al menos un 40 %, en al menos un 45 %, en al menos un 35 %, en al menos un 30 %, en al menos un 25 %, en al menos un 20 % o en al menos un 10 % con respecto a la inflamación en un animal al que no se le ha administrado dicha molécula.

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

### Enfermedad infecciosa

También se describen métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprenden la administración de 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 para un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención son tóxicas para el agente infeccioso, aumentan la respuesta inmunitaria contra dicho agente o aumentan la función efectora contra dicho agente, con respecto a la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Algunas enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse con las moléculas de la invención están causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, protozoos y virus.

Algunas enfermedades víricas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos del presente documento incluyen, pero no se limitan a, las causadas por la hepatitis de tipo A, la hepatitis de tipo B, la hepatitis de tipo C, la gripe, la varicela, adenovirus, el herpes simple de tipo I (HSV-I), el herpes simple de tipo II (HSV-II), la peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, el virus respiratorio sincitial, el virus del papiloma, papova virus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus de la rubéola, polio virus, viruela, el virus de Epstein Barr, el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades víricas tales como meningitis vírica, encefalitis, dengue o viruela.

Algunas enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos del presente documento, que están causadas por bacterias bacteria incluyen, pero no se limitan a, micobacterias rickettsia, micoplasma, neiseria, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (carbunco), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacteria, tétanos, pertissus, cólera, peste, difteria,

clamidia, *S. aureus* y legionela.

Algunas enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos del presente documento, que están causadas por protozoos incluyen, pero no se limitan a, leishmania, coccidios, tripanosoma o malaria.

Algunas enfermedades parásitas que pueden tratarse o prevenirse usando las moléculas de la invención junto con los métodos del presente documento, que están causadas por parásitos incluyen, pero no se limitan a, clamidia y rickettsia.

Según un aspecto de la invención, las moléculas de la invención que comprenden al menos un dominio de unión al epítipo específico para un agente infeccioso muestran una función efectora de anticuerpo hacia dicho agente, por ejemplo, una proteína patógena. Algunos 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 linfotrópico B (LPV); *Bordatella pertussis*; el virus de la enfermedad de Borna (BDV); coronavirus bovino; el virus de la coriomeningitis; el virus del Dengue; un virus, *E. coli*; Ébola; Ecovirus 1; Ecovirus-11 (EV); endotoxina (LPS); bacterias entéricas; el virus huérfano entérico; enterovirus; el virus de la leucemia felina; el virus de la glosopeda; el virus de la leucemia del mono Gibbon (GALV); bacterias gramnegativas; *Helicobacter pylori*; el virus de la hepatitis B (HBV); el virus del herpes simple; el VIH-1; citomegalovirus humanos; coronavirus humanos; gripe A, B & C; Legionella; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; el virus del sarampión; meningococos; morbillivirus; el virus de la hepatitis de ratón; el virus de la leucemia murina; el virus del herpes gamma murino; retrovirus murinos; el virus de la hepatitis de ratón coronavirus murino; *Mycobacterium avium-M*; *Neisseria gonorrhoeae*; el virus de la enfermedad de Newcastle; el Parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; el virus de la varicela; Pseudomonas; Rotavirus; *Samonella typhiurium*; Shigella; estreptococos; el virus linfotrópico de los linfocitos T 1; el virus de la variolovacuna).

#### Desintoxicación

También se describen métodos de desintoxicación en un sujeto expuesto a una toxina (por ejemplo, una molécula dmg tóxica) que comprenden la administración de 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 para la molécula de dmg tóxica. En ciertas 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 incrementa o aumenta la eliminación, la degradación o la neutralización de la toxina con respecto a la eliminación, la degradación o la neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmunotoxicoterapia según los métodos del presente documento puede usarse para el tratamiento de sobredosis o de exposición a fármacos que incluyen, pero no se limitan a, digixina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

#### Terapia de combinación

También se describe la administración de las moléculas de la invención junto con otras terapias conocidas por los expertos en la materia para el tratamiento o la prevención del cáncer, de una enfermedad autoinmune, de una enfermedad infecciosa o de una intoxicación, incluyendo, pero no se limitan a, las actuales quimioterapias convencionales o experimentales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden ser administradas junto 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, de una enfermedad autoinmune, de una enfermedad infecciosa o de una intoxicación.

En ciertas realizaciones, se administra una o más moléculas de la invención a un mamífero, preferentemente a un ser humano, simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer. El término "simultáneamente" no está limitado a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien significa que una molécula de la invención y el otro agente son administrados a un mamífero en una secuencia y en un intervalo de tiempo tal que la molécula de la invención puede actuar junto con el otro agente para proporcionar un aumento en el beneficio con respecto a si fueran administrados de otro modo. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) puede ser administrado al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en puntos temporales diferentes; sin embargo, si se administran al mismo tiempo, deberían ser administrados lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico o deseado. Cada agente terapéutico puede ser administrado por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada. En varias realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 2 horas de diferencia, con entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 3 horas de diferencia, con entre aproximadamente 3 horas y aproximadamente 4 horas de diferencia, con entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 5 horas de diferencia, con entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 6 horas de



diferencia, con entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 7 horas de diferencia, con entre aproximadamente 7 horas y aproximadamente 8 horas de diferencia, con entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 9 horas de diferencia, con entre aproximadamente 9 horas y aproximadamente 10 horas de diferencia, con entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 11 horas de diferencia, con entre aproximadamente 11 horas y aproximadamente 12 horas de diferencia, con no más de 24 horas de diferencia o con no más de 48 horas de diferencia. En las realizaciones preferidas, dos o más componentes son administrados en la misma visita del paciente.

En otras realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos son administrados con entre aproximadamente 2 y 4 días de diferencia, con entre aproximadamente 4 y 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con entre aproximadamente 1 y 2 semanas de diferencia, o con más de 2 semanas de diferencia. En las realizaciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos son administrados en un marco temporal en el que ambos agentes todavía son activos. El experto en la materia será capaz de determinar dicho marco temporal mediante la determinación de la semivida de los agentes administrados.

En ciertas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención son administrados cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo agente y/o de un tercer agente durante un periodo de tiempo, y la repetición de esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir al desarrollo de resistencia a una más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.

En ciertas realizaciones, los agentes profilácticos o terapéuticos son administrados 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 mediante una 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 reposo, al menos 2 semanas de reposo, al menos 3 semanas de reposo. El número de ciclos administrados es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 12 ciclos, más normalmente de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 ciclos, y más normalmente de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 ciclos.

En otras realizaciones más, los agentes terapéuticos y profilácticos de la invención son administrados con unos regímenes de dosificación regulares, bien mediante una infusión continua o bien mediante una administración frecuente sin periodos de reposo prolongados. Dicha administración regular puede implicar la dosificación a unos intervalos constantes sin periodos de reposo. Normalmente, los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se usan a las dosis más bajas. Dichos regímenes de dosificación engloban la administración crónica diaria de unas dosis relativamente bajas durante unos periodos prolongados de tiempo. En las realizaciones preferidas, el uso de unas dosis bajas puede minimizar los efectos tóxicos secundarios y eliminar los periodos de reposo. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos y profilácticos son administrados mediante una infusión crónica a baja dosis o continua que varía entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 2 días, y aproximadamente 1 semana, y aproximadamente 2 semanas, y entre aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 1 mes y aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses, y aproximadamente 4 meses, y aproximadamente 5 meses, y aproximadamente 6 meses. La cronología de dichos regímenes de dosificación puede ser optimizada por el oncólogo.

En otras realizaciones, los cursos de los tratamientos son administrados simultáneamente a un mamífero, es decir, se administran dosis individuales de los productos terapéuticos por separado todavía en un intervalo de tiempo tal que las moléculas de la invención pueden trabajar junto con el (los) otro(s) agente(s). Por ejemplo, un componente puede ser administrado una vez por semana junto con los otros componentes, que pueden ser administrados una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación de los productos terapéuticos se llevan a cabo simultáneamente incluso si los productos terapéuticos no son administrados simultáneamente o en la misma visita del paciente.

Cuando se usan junto con otros agentes terapéuticos y/o profilácticos, las moléculas de la invención y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar aditivamente, o más preferentemente, sinérgicamente. En una realización, una molécula de la invención es administrada simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición terapéutica. En otra realización, una molécula de la invención es administrada simultáneamente con uno o más de otros agentes terapéuticos en composiciones farmacéuticas por separado. Todavía en otra realización, una molécula de la invención es administrada antes o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. También se describe la administración de una molécula de la invención junto con otros agentes profilácticos o terapéuticos a través de la misma o de diferentes vías de administración, por ejemplo, oral y parenteral. En ciertas realizaciones, cuando se administra una molécula de la invención simultáneamente con otro agente profiláctico o terapéutico que potencialmente produce efectos secundarios adversos que incluyen, pero no se limitan a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico puede administrarse ventajosamente a una dosis que está por debajo del umbral que desencadena el efecto secundario adverso.

Las cantidades y las frecuencias de las dosis de la administración proporcionada en el presente documento están

englobadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosis y la frecuencia variarán normalmente según los factores específicos de cada paciente dependiendo del agente terapéutico o profiláctico específico administrado, de la gravedad y del tipo de cáncer, de la vía de administración, así como de la edad, del peso corporal, de la respuesta y de los antecedentes médicos del paciente. Los regímenes adecuados pueden ser seleccionados por el experto en la materia teniendo en consideración dichos factores, y siguiendo, por ejemplo, las dosis indicadas en la bibliografía y recomendadas en el *Physician's Desk Reference* (56ª ed., 2002).

### Agentes antineoplásicos

También se describe la administración de una o más moléculas de la invención con uno o más agentes terapéuticos usados para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. En una realización, pueden administrarse inhibidores de la angiogénesis junto con las moléculas de la invención. Algunos inhibidores de la angiogénesis que pueden usarse en los métodos y en las composiciones descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: Angiostatina (un fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefina; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidores derivados de cartilago (CDI); CAI; el fragmento del complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (un fragmento de colágeno XVIII); un fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; un fragmento de hexasacárido de heparina; HMV833; gonadotropina coriónica humana (hCG); IM-862; Interferón alfa/beta/gamma; proteína inducible por interferón (IP-10); Interleucina 12; Kringle 5 (un fragmento de plasminógeno); Marimastat; inhibidores de la metaloproteinasas (TIMP); 2- Metoxiestradiol 1; MMI 270 (CGS 27023A); el AcMc IMC-1C11; Neovastat; NM-3; Panzem; PI-88; el inhibidor de la ribonucleasa placentaria; el inhibidor del activador del plasminógeno; el factor plaquetar 4 (PF4); Prinomastat; un fragmento de la prolactina de 16 kDa; la proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoides; Solimastat; escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahidrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; tromboespondina 1 (TSP-1); TNP-470; el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ); vasculostatina; vasostatina (un fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de la transferasa de farnesilo (FTI); y bisfosfonatos.

Algunos agentes antineoplásicos que pueden usarse junto con las moléculas de la invención, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramincina; asparraginasas; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar de sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; diazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; elsamitricina; enloplatinato; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorrubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flucitabina; fosquidona; fostriecina de sodio; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxurea; 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-1 a; interferón gamma-1 b; iroplatinato; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol de sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocil; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato de sodio; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamincina; omaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomincina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer de sodio; porfiromincina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatinato; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan de sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de tricribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorrelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinapidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatinato; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina. Otros fármacos antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etniluracilo; abiratorona; aclarrubicina; acilofulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; irografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; anti-proteína morfogenética dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antinaoplaston; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; desaminasa de arginina; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados beta lactámicos; beta-aletina; betaclamincina B; ácido betulínico;

5 inhibidor del bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistratona A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartilago; carzelsina; inhibidores de la cinasa de caseína (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix;

10 clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de la criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidamnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziquona; didamnina B; didox; dietilnoespermina;

15 dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas estrogénicos; antagonistas estrogénicos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirin gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores del glutatión; hepsulfamo; heregulina; hexametilén bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulinoide 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; leuograstim; sulfato de lentinano; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón leucocítico alfa; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorrelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de la matrilisina; inhibidores de la metaloproteinasas de la matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor del MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario malapareado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de la pared celular de miobacterias; mopidamol; inhibidor del gen de la resistencia múltiples fármacos; terapia basada en el supresor de tumores múltiples 1; agente antineoplásico de mostaza; micaperoxida B; extracto de la pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituídas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oacina; inductor de la citocina oral; omaplatino; osatorona; oxalipatino; oxanomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoiltrioxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato pentosan sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perillíco; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidores de la activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer de sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario basado en la proteína A; inhibidor de la cinasa de proteína C; inhibidores de la cinasa de proteína C, de microalgas; inhibidores de la fosfatasa de tirosina de proteína; inhibidores de la fosforilasa de nucleósido de purina; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietilén hemoglobina piridoxilado; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la transferasa de la proteína ras de famesilo; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohikukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidores derivados de la senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena única; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a la somatomedina; sonarmina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidor de la división de las células madre; estipiámina; inhibidores de la estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalan de sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de la trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de la timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante del tiroides; etiopurpurina de etil estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotente; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorrelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de la cinasa de tirosina; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de la urocinasas; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica eritrocitaria; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalamer zinostatina. Algunos fármacos antineoplásicos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

65 Algunos ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en los métodos del presente documento incluyen,

pero no se limitan a, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza) que es un anticuerpo monoclonal inmunosupresor humanizado anti-CD25 para la prevención del rechazo agudo de un aloinjerto renal; PANOREX™ que es un anticuerpo murino anti-antígeno de la superficie celular 17-1A de la IgG2a (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 que es un anticuerpo murino anti-idiotípico (epítipo GD3) de la IgG (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo quimérico anti-EGFR de la IgG (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado anti-integrina  $\alpha v \beta 3$  (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195 que es un anticuerpo humanizado anti-CD33 de la IgG (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™ que es un anticuerpo humanizado anti-CD22 de la IgG (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es un humanizado anti-CD3 de la IgG (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo humanizado anti-factor del complemento 5 (C5) (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- $\alpha$  (CAT/BASF); CDP870 es un anti-fragmento Fab humanizado del TNF- $\alpha$  (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 de la IgG1 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo humano anti-CD4 de la IgG (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo humanizado anti-TNF- $\alpha$  de la IgG4 (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4 \beta 7$  (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo humanizado anti-CD4 de la IgG (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo humanizado anti-CD40L de la IgG (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo humanizado anti-VLA-4 de la IgG (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF- $\beta 2$  (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8: anticuerpos terapéuticos antineoplásicos**

Compañía	Producto	Enfermedad	Objetivo
<b>Abgenix</b>	ABX-EGF	Cáncer	receptor del EGF
<b>AltaRex</b>	OvaRex	Cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	Cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
<b>Antisoma</b>	Theragyn (pentumomabitrío-90)	Cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	Cáncer de mama	antígeno PEM
<b>Boehringer Ingelheim</b>	Blvatuzumab	Cáncer de cabeza y cuello	CD44
<b>Centocor/J&amp;J</b>	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTC A	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Infarto agudo de miocardio	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Apoplejía isquémica	gp IIIb/IIIa
<b>Corixa</b>	Bexocar	NHL	CD20
<b>CRC</b>	AcMc, idiotípico 105AD7	Cáncer colorrectal	gp72
<b>Technology</b>		Vacuna	
<b>Crucell</b>	Anti-EpCAM	Cáncer	Ep-CAM
<b>Cytoclonal</b>	AcMc, cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón no microcítico	NA
<b>Genentech</b>	Herceptina	Cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptina	Cáncer de mama en fase temprana	HER-2
	Rituxan	NHL recidivante/resistente de grado bajo o folicular	CD20
	Rituxan	NHL intermedio y de grado alto	CD20
	AcMc-VEGF	NSCFC, metastásico	VEGF
	AcMc-VEGF	Cáncer colorrectal, metastásico	VEGF
	Fab de AMD	Degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26 (IgE de 2ª gen.)	Rinitis alérgica y asma	IgE
<b>IDEC</b>	Zevalin (Rituxan + itrio 90)	NHL de grado bajo o folicular, recidivante o resistente, positivo para CD20 de linfocitos B y NHL resistente al rituximab	CD20
<b>ImClone</b>	Cetuximab + irinotecán	Carcinoma colorrectal resistente	receptor del EGF
	Cetuximab + cisplatino y	Cáncer de cabeza y cuello recién	receptor del EGF

ES 2 707 152 T3

	radiación	diagnosticado o recurrente	
	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
	Cetuximab + cisplatino	Cáncer de cabeza y cuello (local incurable extensivo - enfermedad regional y metástasis distantes)	receptor del EGF
	Cetuximab + radiación	Carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado	receptor del EGF
	BEC2 + bacilo de Calmette Guerin	Carcinoma de pulmón microcítico	mimetiza un gangliósido GD3
	BEC2 + bacilo de Calmette Guerin	Melanoma	mimetiza un gangliósido GD3
	IMC-1C11	Cáncer colorrectal con metástasis hepáticas	receptor del VEGF
<b>ImmonoGen</b>	nuC242-DMI	Cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
<b>ImmunoMedics</b>	LymphoCide	Linfoma no Hodgkin	CD22
	LymphoCide Y-90	Linfoma no Hodgkin	CD22
	CEA-Cide	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	Tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer colorrectal (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de pulmón (radioimágenes)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Tumores intraoperatorios (radioimágenes)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	Infección de tejidos blandos (radioimágenes)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	Linfomas (radioimágenes)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	Cánceres de hígado de células germinales 7 (radioimágenes)	AFP
<b>Intracel</b>	HumaRAD-HN (+ itrio 90)	Cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	Imágenes colorrectales	NA
<b>Medarex</b>	MDX-101 (CTLA-4)	Cánceres de próstata y otros	CTLA-4
	MDX-210 (sobreexpresión de her-2)	Cáncer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
<b>MedImmune</b>	Vitaxina	Cáncer	$\alpha\beta 3$
<b>Merck KGaA</b>	Mab 425	Varios cánceres	receptor del EGF
	IS-IL-2	Varios cánceres	Ep-CAM
<b>Millennium</b>	Campath (alemtuzumab)	Leucemia linfocítica crónica	CD52
<b>NeoRx</b>	CD20-estreptavidina (+ biotina-itrio 90)	Linfoma no Hodgkin	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	Cáncer metastásico	NA
<b>Peregrine</b>	Onco lym (+ yodo-131)	Linfoma no Hodgkin	HLA-DR 10 beta
	Cotara (+ yodo-131)	Glioma maligno no extirpable	proteínas asociadas al ADN
<b>Pharmacia Corporation</b>	C215 (+enterotoxina estafilocócica)	Cáncer de páncreas	NA
	AcMc, cáncer de pulmón/riñón	Cáncer de pulmón y de riñón	NA
	nacolumab tafenatox (C242 +	Cáncer de colon y de páncreas	NA

enterotoxina estafilocócica)

<b>Protein Design Labs</b>	Nuvion	Tumores de linfocitos T	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	antígeno HLA-DR
<b>Titan</b>	CEAVac	Cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	GD2-gangliósido
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
<b>Trilex</b>	CEAVac	Cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón microcítico	GD2-gangliósido
	TriAb	Cáncer de mama metastásico	MUC-1
<b>Viventia Biotech</b>	NovoMab-G2 radiomarcado	Linfoma no Hodgkin	NA
	Monopharm C	Carcinoma colorrectal y pancreático	antígeno SK-1
	GlioMab-H (+toxina gelonina)	Glioma, melanoma y neuroblastoma	NA
<b>Xoma</b>	Rituxan	NHL recidivante/resistente de grado bajo o folicular	CD20
	Rituxan	NHL intermedio y de grado alto	CD20
	ING-1	Adenocarcinoma	Ep-CAM

#### Agentes inmunomoduladores y agentes antiinflamatorios

5 También se describen métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas de la invención junto con otros agentes de tratamiento. Algunos ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de los linfocitos T y moduladores del receptor de citocinas.

15 Los agentes antiinflamatorios han mostrado éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes, y ahora son un tratamiento común y convencional para dichos trastornos. En los métodos del presente documento puede usarse cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por el experto en la materia. Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, agonistas beta, agentes anticolinérgicos y metil xantinas. Algunos ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozín (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmantina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, la COX-1 y/o la COX-2). Algunos ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, 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 un trastorno autoinmune se presenta en la Tabla 10.

30

**Tabla 9: anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

Nombre del anticuerpo	Antígeno objetivo	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Artritis reumatoide
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar

ES 2 707 152 T3

<b>5G1.1-SC</b>	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
<b>5G1.1-SC</b>	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
<b>ABX-CBL</b>	CBL	Humano		Abgenix Inc	GvHD
<b>ABX-CBL</b>	CD 147	Murino	IgG	Abgenix Inc	Rechazo de aloinjerto
<b>ABX-IL8</b>	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc	Psoriasis
<b>Antegren</b>	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena / Elan	Esclerosis múltiple
<b>Anti-CD11a</b>	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc / Xoma	Psoriasis
<b>Anti-CD18</b>	CD18	Humanizado	Fab'2	Genentech Inc	Infarto de miocardio
<b>Anti-LFA1</b>	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Merieux / Immunotech	Rechazo de aloinjerto
<b>Antova</b>	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
<b>Antova</b>	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	SLE
<b>BTI-322</b>	CD2	De rata	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Psoriasis
<b>CDP571</b>	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Crohn
<b>CDP571</b>	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Celltech	Artritis reumatoide
<b>CDP850</b>	E-selectina	Humanizado		Celltech	Psoriasis
<b>Corsevin M</b>	Factor VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
<b>D2E7</b>	TNF-alfa	Humano		CAT / BASF	Artritis reumatoide
<b>Hu23F2G</b>	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Esclerosis múltiple
<b>Hu23F2G</b>	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc	Apoplejía
<b>IC14</b>	CD14			ICOS Pharm Inc	Choque tóxico
<b>ICM3</b>	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc	Psoriasis
<b>IDEC-114</b>	CD80	Primatizado		IDEC Pharm / Mitsubishi	Psoriasis
<b>IDEC-131</b>	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm / Eisai	SLE
<b>IDEC-131</b>	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm / Eisai	Esclerosis múltiple
<b>IDEC-151</b>	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm / Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
<b>IDEC-152</b>	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma / Alergia
<b>Infliximab</b>	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
<b>Infliximab</b>	TNF-alfa	Quimérico	IgG1	Centocor	Crohn
<b>LDP-01</b>	integrina beta 2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Apoplejía
<b>LDP-01</b>	integrina beta 2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Rechazo de aloinjerto
<b>LDP-02</b>	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Colitis ulcerosa
<b>MAK-195L</b>	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
<b>MDX-33</b>	CD64 (FcR)	Humano		Medarex / Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunes
<b>MDX-CD4</b>	CD4	Humano	IgG	Medarex / Eisai / Genmab	Artritis reumatoide
<b>MEDI-507</b>	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	Psoriasis
<b>MEDI-507</b>	CD2	Humanizado		Medimmune Inc	GvHD
<b>OKT4A</b>	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
<b>OrthoClone OKT4A</b>	CD4	Humanizado	IgG	Ortho Biotech	Enfermedad autoinmune
<b>Orthoclone / anti-CD3 OKT3</b>	CD3	Murino	mlgG2a	Ortho Biotech	Rechazo de aloinjerto
<b>RepPro / Abciximab</b>	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor / Lilly	Complicaciones de la angioplastia coronaria
<b>rhuMab-E25</b>	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech / Novartis / Tanox Biosystems	Asma / Alergia

<b>SB-240563</b>	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma / Alergia
<b>SB-240683</b>	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma / Alergia
<b>SCH55700</b>	IL-5	Humanizado		Celltech / Schering	Asma / Alergia
<b>Simulect</b>	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
<b>SMART a-CD3</b>	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmune
<b>SMART a-CD3</b>	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
<b>SMART a-CD3</b>	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
<b>Zenapax</b>	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab / Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

Tabla 10: anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunes

Anticuerpo	Indicación	Antígeno objetivo
<b>ABX-RB2</b>		anticuerpo contra el antígeno CBL de los linfocitos T, de los linfocitos B y de los linfocitos citolíticos naturales anticuerpo completamente humano del xenotratamiento
<b>5c8 (un anticuerpo contra el antígeno Anti CD-40)</b>	Los ensayos en fase II fueron detenidos en octubre del 99 para analizar los "acontecimientos adversos"	CD-40
<b>IDEC 131</b>	lupus eritematoso sistémico (SLE)	anti CD40 humanizado
<b>IDEC 151</b>	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
<b>IDEC 152</b>	asma	primatizado; anti-CD23
<b>IDEC 114</b>	psoriasis	primatizado anti-CD80
<b>MEDI-507</b>	artritis reumatoide; esclerosis múltiple enfermedad de Crohn; psoriasis	anti-CD2
<b>LDP-02 (anti-AcMc b7)</b>	enfermedad inflamatoria del intestino enfermedad de Chron colitis ulcerosa	receptor de la integrina a4b7 de los glóbulos blancos sanguíneos (leucocitos)
<b>SMART anticuerpo Anti-Interferón Gamma</b>	trastornos autoinmunes	anti-Interferón Gamma
<b>Verteportina</b>	artritis reumatoide	
<b>MDX-33</b>	trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunes púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) anemia hemolítica autoinmune	anticuerpo monoclonal contra los receptores FcRI
<b>MDX-CD4</b>	tratamiento de la artritis reumatoide y de otras autoinmunes	anticuerpo monoclonal contra la molécula del receptor CD4
<b>VX-497</b>	trastornos autoinmunes esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria del intestino lupus psoriasis	inhibidor de la monofosfato deshidrogenasa de inosina (la enzima necesaria para crear nuevo ARN y ADN usado en la producción de los nucleótidos necesarios para la proliferación de los linfocitos)
<b>VX-740</b>	artritis reumatoide	inhibidor de la ICE interleucina-1 beta (la enzima convertidora que controla las rutas que dan lugar a una respuesta inmunitaria agresiva)
<b>VX-745</b>	específico para la inflamación implicada en la señalización química de la aparición de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	inhibidor de la cinasa de proteína activada por la cinasa de mitógeno P38MAP
<b>Enbrel (etanercept)</b>		se dirige al TNF (el factor de necrosis tumoral)
<b>IL-8</b>		anticuerpo monoclonal completamente humano contra la IL-8 (interleucina 8)
<b>Apógeno MP4</b>		antígeno recombinante que destruye selectivamente los linfocitos T asociados a la enfermedad, induce la apoptosis de los



		linfocitos T eliminados mediante una muerte celular programada, que ya no atacan a las propias células del cuerpo
		apógenos específicos dirigidos a linfocitos T específicos

**Agentes para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa**

5 En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden ser administradas junto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o de agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas de la invención junto con antibióticos conocidos por los expertos en la materia para el tratamiento y o la prevención de una enfermedad infecciosa. Algunos antibióticos que pueden usarse junto con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, un macrólido (por ejemplo, tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (por ejemplo, cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozilo (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (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 aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomicina), antibióticos anfenicoles (por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol), antibióticos ansamicinas (por ejemplo, rifamida y rifampina), carbacefems (por ejemplo, loracarbef), carbapenems (por ejemplo, biapenem e imipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactamas (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, fenbenicilina, floxacilina, penamciclina, yodhidruro 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), amfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracina, 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 las mismas (por ejemplo, cinoxacino, clinafloxacino, flumequina y grepagtoxacino), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, nopri sulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (por ejemplo, diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

35 En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención pueden ser administradas junto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Algunos agentes antifúngicos que pueden usarse junto con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrin, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulmina.

40 En algunas realizaciones, las moléculas de la invención pueden ser administradas junto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivíricos. Algunos agentes antivíricos que pueden usarse junto con las moléculas de la invención incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleósido, inhibidores de la transcriptasa inversa de no nucleósido y análogos de nucleósidos. Algunos ejemplos de agentes antivíricos incluyen, pero no se limitan a, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los interferones alfa; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

**Terapia de vacuna**

50 También se describe una composición para la inducción de una respuesta inmunitaria frente a un agente antigénico o inmunogénico que incluye, pero no se limita a, oncoantígenos y antígenos de enfermedades infecciosas (algunos ejemplos de los cuales se divulgan *infra*). Las composiciones de vacuna comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos contra los cuales se desea una respuesta inmunitaria, en las que el uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene un aumento en la afinidad por el FcγRIIIA. Las composiciones de vacunas son particularmente eficaces para desencadenar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

60 En algunas realizaciones, el agente antigénico o inmunogénico de las composiciones de vacuna comprende un virus contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos, y preferentemente están atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados puede llevarse a cabo usando los métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. También se describe una vacuna recombinante de virus vivos o una vacuna recombinante de virus inactivados que va a ser formulada según la

descripción del presente documento. Puede preferirse una vacuna de virus vivos debido a que la multiplicación en el hospedador da lugar a un estímulo prolongado de un tipo y una magnitud similar al que se produce en las infecciones naturales, y por lo tanto confiere una sustancial inmunidad duradera. La producción de dichas formulaciones de vacuna recombinantes de virus vivos puede llevarse a cabo usando los métodos convencionales que implican la propagación del virus en un cultivo celular o en la alantoides de embrión de pollo, seguido de una purificación.

En una realización específica, el virus recombinante no es patógeno para el sujeto al que se le va a administrar. A este respecto, el uso de virus modificados genéticamente con propósitos de vacuna puede requerir la presencia de unas características de atenuación en estas cepas. La introducción de las mutaciones apropiadas (por ejemplo, deleciones) en los moldes usados para la transfección puede proporcionar a los nuevos virus unas características de atenuación. Por ejemplo, pueden realizarse mutaciones específicas sin sentido que están asociadas con una sensibilidad a la temperatura o una adaptación al frío en unas mutaciones por deleción. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con los mutantes sensibles al frío o a la temperatura, y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para la modificación de virus recombinantes son conocidas en la materia. Por ejemplo, las técnicas para la modificación de virus de ARN de hebra negativa son conocidas en la materia, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.166.057.

Alternativamente, pueden construirse virus quiméricos con características "suicidas" para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Dichos virus solo experimentarían una o unas pocas rondas de replicación en el hospedador. Cuando se usa como vacuna, el virus recombinante debería experimentar unos ciclos de replicación limitados e inducir un nivel suficiente de respuesta inmunitaria, pero no iría más allá en el hospedador humano como para causar una enfermedad. Alternativamente, pueden formularse virus inactivados (destruidos). Las formulaciones de vacuna con virus inactivados pueden prepararse usando las técnicas convencionales para "destruir" los virus quiméricos. Las vacunas con virus inactivados están "muertas" en el sentido de que se ha destruido su infectividad. Idealmente, la infectividad del virus es destruida sin afectar a su inmunogenicidad. Con objeto de preparar vacunas con virus inactivados, puede cultivarse el virus quimérico en un cultivo celular o en la alantoides de embrión de pollo, purificarse mediante una ultracentrifugación zonal, inactivarse con formaldehído o  $\beta$ -propiolactona y agruparse.

En ciertas realizaciones, pueden modificarse en el virus epítomos completamente foráneos, incluyendo los antígenos derivados de patógenos víricos o no víricos, para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Por ejemplo, pueden modificarse los antígenos de virus no relacionados tales como el VIH (gp160, gp120, gp41), antígenos parásitos (por ejemplo, malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales, en la cepa atenuada.

Puede construirse prácticamente cualquier secuencia génica heteróloga en el virus quimérico para su uso en las formulaciones de vacuna intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias génicas heterólogas son fracciones y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, los epítomos que inducen una respuesta inmunitaria protectora frente a cualquiera de una diversidad de patógenos, o los antígenos que se unen a los anticuerpos neutralizantes, pueden ser expresados por, o como parte de, los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias génicas heterólogas que pueden ser construidas en los virus quiméricos incluyen, pero no se limitan a, neuraminidasa de hemaglutinina de la gripe y la paragripe y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F del PIV3 humano. En otra realización más, las secuencias génicas heterólogas que pueden ser construidas en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Algunos ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero no se limitan a, citocinas, interferón de tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina 1, 2, 4, 5, 6, 12 y los antagonistas de estos agentes.

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

En algunas realizaciones alternativas, las composiciones de vacuna comprenden un polipéptido de fusión en el que un agente antigénico o inmunogénico está unido operativamente a un anticuerpo variante descrito en el presente documento que tiene un aumento en la afinidad por el Fc $\gamma$ RIIIA. Los polipéptidos de fusión modificados para su uso en las composiciones de vacuna se crean usando los métodos rutinarios de la tecnología del ADN recombinante, y están ampliamente en el nivel de la pericia habitual.

También se describen métodos para la inducción de tolerancia en un sujeto mediante la administración de una composición. Preferiblemente, una composición adecuada para la inducción de tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con un anticuerpo variante descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo variante tiene una afinidad mayor por el Fc $\gamma$ RIIB. Aunque sin pretender estar ligados a ningún mecanismo de acción en particular, dichas composiciones son eficaces en la inducción de tolerancia mediante la activación de la ruta inhibidora mediada por el Fc $\gamma$ RIIB.

## 65 Composiciones y métodos de administración

También se describen métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de la invención (es decir, los diacuerpos) que comprenden múltiples dominios de unión al epítipo y, opcionalmente, un dominio Fc (o una porción del mismo). También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión o de una molécula conjugada según se describe en el presente documento, o de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada según se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada está sustancialmente purificado (es decir, sustancialmente exento de sustancias que limiten su efecto o que produzcan unos efectos secundarios indeseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomólogo, y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización preferida más, el anticuerpo es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden ser usados para la administración de 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 y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro vector, etc. Algunos métodos de administración de una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, por las vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de la invención son administradas por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden ser administradas mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante una infusión o una inyección en bolo, mediante su absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, la mucosa oral, la mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administradas junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o de un nebulizador y de una formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 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 nº WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

También se describe que las moléculas de la invención están envasadas en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecillo que indica la cantidad de anticuerpo. En una realización, las moléculas de la invención son suministradas en forma de un polvo liofilizado esterilizado seco o de un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente y pueden ser reconstituidas, por ejemplo, con agua o con una solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de la invención son suministradas en forma de un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente de al menos 10 mg, de al menos 15 mg, de al menos 25 mg, de al menos 35 mg, de al menos 45 mg, de al menos 50 mg o de al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la invención deberían ser almacenadas a entre 2 y 8 °C en su recipiente original, y las moléculas deberían ser administradas en las 12 horas, preferentemente en las 6 horas, en las 5 horas, en las 3 horas o en 1 hora después de haber sido reconstituidas. En una realización alternativa, las moléculas de la invención son suministradas en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y la concentración de la molécula, de la proteína de fusión o de la molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas de la invención son suministradas en un recipiente sellado herméticamente con al menos 1 mg/ml, más preferentemente con al menos 2,5 mg/ml, con al menos 5 mg/ml, con al menos 8 mg/ml, con al menos 10 mg/ml, con al menos 15 mg/kg, con al menos 25 mg/ml, con al menos 50 mg/ml, con al menos 100 mg/ml, con al menos 150 mg/ml, con al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de la composición que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede ser determinada mediante las técnicas clínicas habituales. La dosis precisa que va a ser empleada en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debería decidirse según el juicio del profesional y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas a partir de los sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

Para los diacuerpos englobados por la invención, la dosis administrada a un paciente es normalmente de entre 0,0001 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente es de entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, de entre 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, de entre 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, de entre 0,0001 y 2 mg/kg, de entre 0,0001 y 1 mg/kg, de entre 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, de entre 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de entre 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, de entre 0,0001 y 0,15 mg/kg, de entre 0,0001 y 0,10 mg/kg, de entre 0,001 y 0,5 mg/kg, de entre 0,01 y 0,25 mg/kg o de entre 0,01 y 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis y la frecuencia de administración de los diacuerpos de la invención puede ser reducida o alterada aumentando la captación y la penetración tisular de los diacuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, una lipidación.

En una realización, las dosis de las moléculas de la invención administradas a un paciente son de entre 0,01 mg y

1.000 mg/día, cuando se usan en forma de un agente de monoterapia. En otra realización las moléculas de la invención se usan junto con otras composiciones terapéuticas, y las dosis administradas a un paciente son menores que cuando dichas moléculas se usan en forma de un agente de monoterapia.

5 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en la zona en necesidad de tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo y en modo alguno como limitación, mediante una infusión local, mediante una inyección o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado en usar materiales en los  
10 que no se absorba la molécula.

En otra realización, las composiciones pueden ser administradas en una vesícula, en particular en un liposoma (véase, Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 3 17-327; véase de forma general, *ibid.*).

En otra realización más, las composiciones pueden ser administradas en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por el experto en la materia para la producción de las formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más moléculas de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radio immunotherapy 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 Fam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Focal Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase Fanger, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88: 507; y Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para conseguir la liberación controlada de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Fanger 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); Ranger y Peppas, 1983, *L. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; véase también Fevy *et al.*, 1985, *Science* 228: 190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1: 105); la Patente de Estados Unidos nº 5.679.377; la Patente de Estados Unidos nº 5.916.597; la Patente de Estados Unidos nº 5.912.015; la Patente de Estados Unidos nº 5.989.463; la Patente de Estados Unidos nº 5.128.326; la publicación PCT nº WO 99/15154; y la publicación PCT nº WO 99/20253). Algunos ejemplos de los polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxi etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PEG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PEA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y polioésteres. En otra realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades del agente terapéutico (por ejemplo, en los pulmones), y por lo tanto se requiere únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). En otra realización, se usan las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada según Dunn *et al.* (véase el documento U.S. 5.945.155). Este método en particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo desde el sistema polimérico. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte del cuerpo del paciente en necesidad de tratamiento terapéutico. En otra realización se usa un sistema de administración sostenida no polimérico mediante el cual se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras su implantación en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, se dispersará o lixiviará desde la composición hacia el fluido tisular circundante, y el material no polimérico coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida (véase el documento U.S. 5.888.533).

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

En una realización específica, cuando la composición es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la invención, el ácido nucleico puede ser administrado *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrándolo de forma que se haga intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retrovírico (véase la Patente de Estados Unidos nº 4.980.286), o mediante una inyección directa, o mediante el uso del bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o un recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o con agentes

de transfección, o mediante su administración unido a un péptido de tipo homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88: 1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse un ácido nucleico intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula hospedadora para su expresión mediante una recombinación homóloga.

5 El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la invención puede incluir un único tratamiento, o preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata un sujeto con las moléculas de la invención en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente durante entre 2 y 8 semanas, más preferentemente durante entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez por semana, dos veces por 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 aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento en particular.

### Composiciones farmacéuticas

20 Las composiciones incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la elaboración de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico divulgado en el presente documento o una combinación de esos agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la invención y otro anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico tumoral) que es específico para un oncoantígeno en particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo sanitario del gobierno federal o estatal, o recogido en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra Farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, a un adyuvante (por ejemplo, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), a un excipiente o a un vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Algunos excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o de agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

50 Generalmente, los ingredientes de las composiciones son suministrados por separado o se mezclan entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecillo que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a ser administrada mediante una infusión, puede ser dispensada con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición es administrada mediante una inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua o de una solución salina estéril para inyección, de forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

60 Las composiciones pueden estar formuladas como formas neutras o de sal. Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas con aniones tales como las obtenidas a partir de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y aquellas formadas con cationes tales como las obtenidas a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

### Terapia génica

65 En una realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que codifican las moléculas de la invención, son administrados para el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con

una enfermedad, un trastorno o una infección, a modo de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia que se realiza mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificados que median en un efecto terapéutico o profiláctico.

5 Pueden usarse cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la materia. Algunos ejemplos de métodos se describen a continuación.

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

20 Una composición puede comprender ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un hospedador adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico tisular. En otra realización en particular, las moléculas de ácido nucleico se usan en las secuencias codificantes del anticuerpo, y cualquier otra secuencia deseada está flanqueada por las regiones que promueven la recombinación homóloga en el sitio deseado del genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Roller y Smities, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 8932-8935; y Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342: 435-438).

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

35 La administración de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es expuesto directamente al ácido nucleico o a los vectores portadores del ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, después son trasplantadas al sujeto. Estas dos metodologías se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

40 En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos son administradas directamente *in vivo*, donde son expresadas para producir el producto codificado. Esto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante su construcción como parte de un vector de expresión del ácido nucleico adecuado y su administración de forma que se hagan intracelulares, por ejemplo, mediante una infección usando retrovirus defectuosos o atenuados u otros vectores víricos (véase la Patente de Estados Unidos nº 4.980.286), o mediante una inyección directa del ADN desnudo, o mediante el uso de un bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o un recubrimiento con lípidos o con receptores de la superficie celular o con agentes de transfección, una encapsulación en liposomas, en micropartículas o en microcápsulas, o mediante su administración unidas a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, mediante su administración unidas a un antígeno sometido a una endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432) (que puede usarse para los tipos de células objetivo que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-un antígeno en los que un antígeno comprende un péptido vírico fusogénico para disociar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para una captación y una expresión celular específica, mediante su direccionamiento a un receptor específico (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado en el ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante una recombinación homóloga (KoHer y Smities, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 8932-8935; y Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342: 435-438).

60 En una realización específica, se usan vectores víricos que contienen las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molécula de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase, Miller *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma vírico y su integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se va a usar en la terapia génica son clonadas en uno o más vectores, lo que facilita la administración de

65

la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Pueden encontrarse más detalles sobre los vectores retrovéricos en Boesen *et al.*, (1994, *Biotherapy* 6: 291-302), que describe el uso de un vector retrovérico para la administración del gen mdr 1 a células madre hematopoyéticas con objeto de hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovéricos en la terapia génica son: Clowes *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 93: 644-651; Klein *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores víricos que pueden usarse en la terapia génica. Los adenovirus son unos vehículos especialmente atractivos para la administración de genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de forma natural el epitelio respiratorio, donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se están dividiendo. Kozarsky y Wilson (*Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499-503, 1993, presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, (*Human Gene Therapy*, 5: 3-10, 1994) muestran el uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros casos de uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld *et al.*, 1991, *Science* 252: 431-434; en Rosenfeld *et al.*, 1992, *Cell* 68: 143-155; en Mastrangeli *et al.*, 1993, *J. Clin. Invest.* 91: 225- 234; en la Publicación PCT W094/12649; y en Wang *et al.*, 1995, *Gene Therapy* 2: 775-783. En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.

También se han propuesto los virus adenoasociados (AAV) para su uso en la terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh *et al.*, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 204: 289-300 y la Patente de Estados Unidos nº 5.436.146).

Otra metodología de la terapia génica implica la transferencia de un gen a las células de un cultivo tisular mediante métodos tales como una electroporación, una lipofección, una transfección mediada por fosfato de calcio o una infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se colocan bajo la selección para aislar aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Después, esas células son administradas a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico es introducido 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 materia que incluye, pero no se limita a, una transfección, una electroporación, una microinyección, una infección con un vector vírico o un bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, una fusión celular, una transferencia génica mediada por un cromosoma, una transferencia génica mediada por una microcélula, una fusión de esferoplastos, etc. En la materia se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes foráneos en células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, 1993, *Meth. Enzymol* 217: 599-618, Cohen *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol* 217: 618-644; y *Clin. Pharma. Ther.* 29: 69-92, 1985) y pueden usarse con la condición de que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células del receptor. La técnica debería proporcionar una transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de forma que el ácido nucleico sea expresable por la célula, y preferentemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes pueden ser administradas a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la materia. Las células recombinantes sanguíneas (por ejemplo, las células madre hematopoyéticas o progenitoras) son administradas preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células contemplada para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede ser determinada por el experto en la materia.

Las células en las que puede ser introducido un ácido nucleico con propósitos de terapia génica engloban cualquier tipo de célula deseado disponible e incluyen, pero no se limitan a, 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 hematopoyéticas o progenitoras, por ejemplo, según se obtienen a partir de la médula ósea, de la sangre del cordón umbilical, de sangre periférica, de hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para la terapia génica es autóloga al sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión son introducidas en las células de forma que sean expresables por las células o por su progenie, y después las células recombinantes son administradas *in vivo* para su efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o células progenitoras. Potencialmente puede usarse cualquier célula madre y/o progenitora que pueda ser aislada y mantenida *in vitro* según esta realización (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, *Cell* 1 1: 973-985; Rheinwald, 1980, *Meth. Cell Bio.* 21 A: 229; y Pittelkow y Scott, 1986, *Mayo Clinic Proc.* 61: 771).

En una realización específica, el ácido nucleico que va a ser introducido con propósitos de terapia génica comprende un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de forma que la expresión del ácido nucleico es controlable mediante el control de la presencia o de la ausencia del apropiado inductor de la transcripción.

**Kits**

También se describe un paquete o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen las moléculas de la invención. Adicionalmente, también puede incluirse uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad en el paquete o el kit farmacéutico. También se describe un paquete o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que contienen uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Opcionalmente, asociado a dicho(s) recipiente(s) puede haber un prospecto en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, prospecto que refleja la aprobación por parte del organismo de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos.

También se describen kits que pueden ser usados en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende una o más moléculas de la invención. En otra realización, un kit comprende uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende adicionalmente uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más oncoantígenos asociados con un cáncer. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es una sustancia terapéutica biológica u hormonal.

**Caracterización y demostración de la utilidad terapéutica**

Los diversos aspectos de las composiciones farmacéuticas, de los agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento se prueban preferentemente *in vitro*, en un sistema de cultivo celular y en un organismo de un modelo animal, tal como un sistema de modelo animal de roedor, para analizar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, algunos ensayos que pueden usarse para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica incluyen ensayos de cultivo celular en los que se cultiva una muestra de tejido del paciente en un cultivo y se expone o se pone en contacto de otro modo con una composición farmacéutica descrita en el presente documento y se observa el efecto de dicha composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse mediante una biopsia del paciente. Esta prueba permite a la identificación de la(s) molécula(s) profilácticas o terapéuticas terapéuticamente más eficaces para cada paciente individual. En varias realizaciones específicas pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células representativas de los tipos celulares individuales implicados en un trastorno autoinmune o inflamatorio (por ejemplo, linfocitos T), para determinar si una composición farmacéutica descrita en el presente documento tiene un efecto deseado sobre dicho tipo celular.

Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelo animal incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal bien conocido en la materia. Las combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden probarse en un sistema de modelo de ratón. Dichos sistemas de modelo son ampliamente usados y bien conocidos por el experto. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos pueden ser administrados repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si dichos agentes son administrados por separado o en forma de una mezcla.

Algunos modelos de animal preferidos para su uso en los métodos del presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón, por ejemplo, puede usarse cualquier modelo de ratón descrito en el documento U.S. 5.877.396. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ratones portadores del FcγRIIA humano; ratones portadores del FcγRIIA humano; ratones portadores del FcγRIIB y del FcγRIIA humano; ratones portadores del FcγRIIB y del FcγRIIA humano. Preferiblemente, se probarán las mutaciones que muestren los mayores niveles de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente para su uso en los estudios con un modelo de animal antes de su uso en seres humanos. Pueden prepararse unas cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en los modelos de animales usando los métodos descritos *supra*, por ejemplo, usando unos sistemas de expresión de mamífero y los métodos de purificación divulgados y ejemplificados en el presente documento.

Pueden usarse modelos de xenoinjerto de ratón para el análisis de la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra un objetivo tumoral específico basándose en la afinidad y en la especificidad de los dominios de unión al epítipo de la molécula de anticuerpo de la invención, y en la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta inmunitaria (Wu et al., 2001, Trends Cell Biol. 11: S2-9). Los ratones transgénicos que expresan los FcγR humanos en células efectoras de ratón son unos modelos de animal hechos a medida para probar la eficacia de las interacciones Fc-FcγR humano. Pueden usarse pares de líneas de ratón transgénicas FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licenciamiento con la Rockefeller U. y el Sloan Kettering Cancer center), tales como las recogidas en la siguiente Tabla 11.

**Tabla 11: cepas de ratón**

65



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

- 5 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación puede ser determinada mediante el uso de varios modelos de animal experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la materia y descritos en Crofford L. J. y Wilder R. L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals", en *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty *et al.* (eds.), capítulo 30 (Lee y Febiger, 1993). También pueden usarse en modelos de animal experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y de enfermedades reumáticas autoinmunes, para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos, y no como limitación.
- 10 Los principales modelos de animal de artritis o de enfermedad inflamatoria conocidos en la materia y ampliamente usados incluyen: modelos de rata de artritis inducida por un adyuvante, modelos de rata y de ratón de artritis inducida por colágeno, y modelos de rata, de conejo y de hámster de artritis inducida por un 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).
- 15 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación puede evaluarse usando un modelo de rata de artritis inducida por carragenano. La artritis inducida por carragenano también se ha usado en conejos, perros y cerdos en estudios de artritis crónica o de inflamación. Se usa una evaluación histomorfométrica cuantitativa para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos que usan dicho modelo de artritis inducida por carragenano se describen en Hansra P. *et al.*, "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24 (2): 141-155, (2000). También se usan habitualmente los modelos de animal de inflamación inducida por zimosan, como es conocido y se describe en la materia.
- 20 La actividad antiinflamatoria de las terapias de combinación también puede ser evaluada midiendo en la rata la inhibición del edema en una pata inducido por carragenano, usando una modificación del método descrito en Winter C. A. *et al.*, "Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs" *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* III, 544-547, (1962). Este ensayo se ha usado como un cribado primario *in vivo* de 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 de prueba se expresa como el porcentaje de inhibición del aumento en el peso de la pata trasera del grupo de prueba con respecto al grupo de control al que se le ha administrado vehículo.
- 25 Adicionalmente, también pueden usarse modelos de animal de enfermedad inflamatoria del intestino para evaluar la eficacia de las terapias de combinación (Kim *et al.*, 1992, *Scand. J. Gastroenterol.* 27: 529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30 (12 Supl.): 3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humanas que pueden ser inducidas en animales. Pueden administrarse polisacáridos que incluyen, pero no se limitan a, amilopectina, carrageno, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano, o productos químicos irritantes que incluyen, pero no se limitan a, ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) y ácido acético a los animales por vía oral, para inducir enfermedades inflamatorias del intestino.
- 30 También pueden usarse modelos de animal de trastornos autoinmunes para evaluar la eficacia de las terapias de combinación. Se han desarrollado modelos de animal para trastornos autoinmunes tales como la diabetes de tipo 1, la autoinmunidad tiroidea, el lupus eritematoso sistémico y la glomerulonefritis (Flanders *et al.*, 1999, *Autoimmunity* 29: 235-246; Krogh *et al.*, 1999, *Biochimie* 81: 511-515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol* 19: 12-24).
- 35 Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación divulgadas en el presente documento para las enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.
- 40 La toxicidad y la eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos pueden ser determinadas mediante los procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para la determinación de la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y de la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede ser expresado como la proporción de DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestren unos índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse agentes profilácticos y/o terapéuticos que muestren unos efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija
- 45
- 50
- 55

dichos agentes al sitio de tejido afectado con objeto de minimizar el daño potencial a las células no infectadas, y reducir así los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos en cultivos celulares y en los estudios con animales pueden usarse en la formulación de un abanico de dosis de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosis de dichos agentes está preferentemente en un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en el método descrito en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos con cultivos celulares. Una dosis puede estar formulada en modelos de animal para conseguir una concentración plasmática en circulación que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante una cromatografía de líquidos de alta resolución.

La actividad antineoplásica de las terapias usadas según la presente invención también puede ser determinada mediante el uso de varios modelos de animal experimental para el estudio del cáncer, tales como el modelo de ratón SCID o de ratón transgénico o de ratón atímico con xenoinjertos humanos, modelos de animal, tales como hámsteres, conejos, etc. conocidos en la materia 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).

Algunos modelos de animal preferidos para la determinación de la eficacia terapéutica de las moléculas de la invención son modelos de xenoinjerto de ratón. Algunas líneas celulares tumorales que pueden usarse como fuente para los xenoinjertos de tumores incluyen, pero no se limitan a, células SKBR3 y MCF7, que pueden proceder de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen los receptores tanto erbB2 como de la prolactina. Las células SKBR3 se han usado de forma rutinaria en la materia como modelos de ADCC y de xenoinjerto de tumor. Alternativamente, pueden usarse las células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano como fuente para los xenoinjertos de tumores.

Los protocolos y las composiciones se prueban preferentemente *in vitro* y después *in vivo*, para evaluar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes y los métodos terapéuticos pueden ser cribados usando células de un tumor o de una línea celular maligna. Pueden usarse muchos ensayos convencionales en la materia para evaluar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse mediante la medición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, mediante un recuento celular directo, mediante la detección de los cambios en la actividad de transcripción de genes conocidos tales como proto-oncogenes (por ejemplo, fos, myc) o de marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular puede evaluarse mediante una tinción con *trypan blue*, la diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en los cambios en la morfología, en la disminución en el crecimiento y/o en la formación de colonias en agar blando o la formación de una red tubular en una membrana de base tridimensional o una preparación de matriz extracelular, etc.

Los compuestos para su uso en terapia pueden ser probados en sistemas de modelo animal adecuados antes de su prueba en seres humanos, incluyendo, pero no se limitan a, en ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos de animal descritos anteriormente. Después, los compuestos pueden usarse en los ensayos clínicos apropiados.

Además, puede usarse cualquier ensayo conocido por los expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias de combinación divulgadas en el presente documento para el tratamiento o la prevención del cáncer, de un trastorno inflamatorio o de una enfermedad autoinmune.

## Ejemplos

### Diseño y caracterización de diacuerpos biespecíficos covalentes

Se construyó un diacuerpo monoespecífico covalente y un diacuerpo biespecífico covalente para evaluar la producción recombinante, la purificación y las características de unión de cada uno. Se encontró que las moléculas de diacuerpos purificadas por afinidad que fueron producidas mediante los sistemas de expresión recombinante descritos en el presente documento, mediante un análisis de SDS-PAGE y de SEC, consistían en especies diméricas individuales. Los análisis de ELISA y de SPR revelaron además que el diacuerpo biespecífico covalente mostraba afinidad por ambos antígenos objetivo y podría unirse simultáneamente a ambos antígenos.

### Materiales y métodos:

Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir cuatro construcciones polipeptídicas, representadas esquemáticamente en la FIG. 2. La construcción 1 (la SEQ ID NO: 9) comprendía el dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce el FcγRIIB y el dominio VH

del anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce el FcγRIIIA. La construcción 2 (la SEQ ID NO: 11) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. La construcción 3 (la SEQ ID NO: 12) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. La construcción 4 (la SEQ ID NO: 13) comprendía 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 o VH fueron amplificadas a partir del ADN de molde usando cebadores directos e inversos diseñados de forma que los productos iniciales de la PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR de solapamiento generara las secuencias codificantes de las construcciones polipeptídicas deseadas.

**Amplificación inicial mediante una PCR del ADN de molde:** se mezclaron suavemente aproximadamente 35 ng del ADN de molde, por ejemplo, la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de interés; 1 µl de los cebadores directo e inverso 10 µM; 2,5 µl de 10x de tampón pfuUltra (Stratagene, Inc.); 1 µl de dNTP 10 mM; 1 µl de 2,5 unidades/µl de polimerasa de ADN pfuUltra (Stratagene, Inc.); y agua destilada hasta un volumen total de 25 µl, en un tubo de microfuga, y se rotaron brevemente en una microcentrifuga para recoger la mezcla de reacción del fondo del tubo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el sistema de PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystem) y los siguientes ajustes: 94 °C, 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C, cada 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; y 72 °C, 1 minuto.

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

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

**PCR de solapamiento:** los productos iniciales de la PCR se combinaron como se describe a continuación y se amplificaron usando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación inicial del ADN de molde. Los productos de la PCR de solapamiento también fueron purificados según se ha descrito *supra*.

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

Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, la SEQ ID NO: 57) y los cebadores inversos de los dominios VH (es decir, la SEQ ID NO: 60 y SlA EQ ID NO: 63) contenían unos sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de la PCR de solapamiento purificados fueron digeridos con las endonucleasas de restricción Nhe I y EcoR I y clonados en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codifican las construcciones se diseñaron según se identifica en la Tabla 12:

**Tabla 12. Construcciones de plásmidos**

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

**Expresión del polipéptido/diacuerpo:** el pMGX0669, que codifica la construcción 1, fue cotransfectado con el pMGX0667, que codifica la construcción 2, en células HEK-293 usando Lipofectamina 2000 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos estaba diseñada para que diera lugar a la

expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmunoespecífico tanto para el Fc $\gamma$ RIIB como para el Fc $\gamma$ RIIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). El pMGX0666 y el pMGX0668, que codifican las construcciones 3 y 4, respectivamente, fueron transfectados por separado en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo mono-específico covalente (CMD), inmunoespecífico para el Fc $\gamma$ RIIIA (el diacuerpo h3G8) y para el Fc $\gamma$ RIIB (el diacuerpo h2B6), respectivamente. Después de tres días en el cultivo, los productos secretados se purificaron a partir del medio condicionado.

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

**SEC:** se usó una cromatografía de exclusión por tamaños para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos desde la columna. El análisis de SEC se llevó a cabo en una columna GE healthcare Superdex 200HR 10/30 y equilibrada con PBS. La comparación con los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~ 150 kDa), de un fragmento Fab (~ 50 kDa) y de un Fv de cadena única (~ 30 kDa) se usaron como controles).

**ELISA:** la unión de los diacuerpos eluidos y purificados fue caracterizada mediante un ensayo de ELISA, según se describe en 5.4.2. Se recubrieron 50  $\mu$ l/pocillo de una solución de 2  $\mu$ g/ml de sCD32B-Ig en una placa de 96 pocillos Maxisorp en tampón de carbonato a 4 °C durante una noche. Se lavó 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 la temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron el h2B6-h3G8 CBD, el h2B6 CMD o el h3G8 CMD en el tampón de bloqueo en diluciones dobles sucesivas para generar un abanico de concentraciones de diacuerpo, desde 0,5  $\mu$ g/ml hasta 0,001  $\mu$ g/ml. Después la placa se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS-T, se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de sCD16A-Biotina a 0,2  $\mu$ g/ml a cada pocillo. La placa se incubó de nuevo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS-T, se usaron 50  $\mu$ l/pocillo de una dilución a 1:5.000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) para la detección. La HRP-estreptavidina se dejó en incubación durante 45 minutos a la temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se reveló usando 80  $\mu$ l/pocillo de sustrato de TMB. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción de HRP-TMB se detuvo mediante la adición de 40  $\mu$ l/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %. Se leyó la DO450 nm mediante el uso de un lector de placas de 96 pocillos y el programa informático SOFTmax, y los resultados se representaron gráficamente usando el programa informático GraphPadPrism 3.03.

**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 programa informático asociado según se describe en la sección 5.4.3.

Se inmovilizaron el sCD16A, el sCD32B o el sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (la celda de flujo 2) de la superficie de un chip sensor a través de una química de acoplamiento de amina (mediante la modificación de los grupos carboximetilo con una mezcla de NHS/EDC) de forma que se inmovilizaron aproximadamente 1.000 unidades de respuesta (UR) de cualquiera de los receptores en la superficie. Después de esto, los ésteres activos sin reaccionar fueron 'inactivados' con una inyección de Et-NH<sub>2</sub> 1 M. Una vez preparada una superficie adecuada, se pasaron los diacuerpos biespecíficos covalentes (el CBD h2B6-h3G8) o los diacuerpos mono-específicos covalentes (el CMD h2B6 o el CMB h3G8) por encima de la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una solución 6,25-200 nM a un caudal de 70 ml/min caudal. También se probó el scFV h3G8 como comparación.

Una vez recogido un conjunto total de datos, las curvas de unión resultantes fueron ajustadas globalmente usando los algoritmos informáticos suministrados por el fabricante, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Estos algoritmos calculan tanto la K<sub>on</sub> como la K<sub>off</sub>, a partir de las cuales se deduce la constante de unión en equilibrio aparente, K<sub>D</sub>, como la proporción entre las dos constantes de velocidad (es decir, K<sub>off</sub>/K<sub>on</sub>). Un tratamiento más detallado de cómo se derivan las constantes de velocidad individuales puede encontrarse en el BIAevaluation Softwson Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y de disociación se ajustaron por separado. Se obtuvo la constante de velocidad de disociación para un 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 Langmuir 1:1, y el ajuste de la base se seleccionó sobre la base de criterios de R<sub>máx</sub> y  $\chi^2$  para los diacuerpos biespecíficos y el scFv; se usó el ajuste del analito bivalente para la unión del CMD.

## Resultados

El análisis de SDS-PAGE en unas condiciones no reductoras reveló que el producto purificado de los sistemas de

expresión CMD h3G8, CMD h2B6 y CBD h2B6-h3G8 era, cada uno, una especie individual con un peso molecular estimado de aproximadamente 50 kDa (FIG. 3, carriles 4, 5 y 6, respectivamente). En unas condiciones reductoras, el producto purificado a partir de cualquiera de los sistemas de expresión del CMD corrió como una banda individual (carriles 1 y 2), mientras que se reveló que el producto purificado a partir del sistema del CBD h2B6-h3G8 eran 2 proteínas individuales (FIG. 3, carril 3). Todos los polipéptidos purificados a partir del sistema de expresión y visualizados mediante una 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 única especie molecular (FIG. 4B), cada una de las cuales eluía aproximadamente al mismo tiempo que un fragmento Fab de la IgG (~ 50 kDa) (FIG. 4A). Los resultados indican que el producto purificado por afinidad era un homodímero covalente homogéneo para el caso del sistema de expresión del CMD, y un heterodímero covalente homogéneo para el caso del CBD h2B6-h3G8.

Se usó un ensayo de ELISA en sándwich para probar la especificidad de unión del CBD h2B6-h3G8 por cualquiera o ambos de la CD32B y/o de la CD16A (FIG. 5). La CD32B sirvió como antígeno objetivo, y se usó la CD16A como la sonda secundaria. La señal positiva del ELISA reveló que el CBD heterodimérico h2B6-h3G8 tenía especificidad por ambos antígenos. Una prueba similar con el CMD h3G8 (que no debería unirse al CD32B) no mostró ninguna señal.

El análisis de SPR indicó que el CMD h3G8 reconocía inmunoespecíficamente la sCD16 pero no la sCD32B, que el CMD h2B6 reconocía inmunoespecíficamente la sCD32B pero no la sCD16, y que el CBD h2B6-h3G8 reconocía inmunoespecíficamente tanto la sCD16 como la sCD32B (FIGS. 6A-B). Ninguno de los diacuerpos probados se unió al receptor de control, la 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 frente a la sCD16 y/o a la sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un scFv de h3G8. Las FIGS. 7A-E muestran los resultados gráficos del análisis de SPR. Las constantes cinéticas *on* y *off*, así como la constante de equilibrio, calculadas a partir de los resultados representados en la FIG. 7, se proporcionan en la Tabla 13.

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

Receptor / Analito	k-on	k-off	Kd
diacuerpo sCD16/h3G8	<b>2,3 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0,004</b>	<b>18,0</b>
CBD sCD16/h2B6-h3G8	<b>4,6 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0,010</b>	<b>22,7</b>
scFv sCD16/h3G8	<b>3,2 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0,013</b>	<b>38,7</b>
CBD sCD32B / h2B6-h3G8	<b>3,6 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0,005</b>	<b>15,0</b>
diacuerpo sCD32B / h2B6	<b>6,2 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0,013</b>	<b>21,0</b>

Acoplados con los resultados del análisis del ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 retenía la especificidad por ambas CD32B y CD16 y era capaz de unirse a ambos antígenos simultáneamente. La molécula está representada químicamente en la FIG. 8.

### Diseño y caracterización de diacuerpos biespecíficos covalentes que comprenden dominios Fc

En un esfuerzo por crear una molécula de tipo IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, uno de los polipéptidos que comprende la molécula heterodimérica CBD presentada en el Ejemplo 6.1 fue modificado para que comprendiera adicionalmente un dominio Fc (creando una cadena 'más pesada' y una 'más ligera', análogas a la cadena pesada y ligera de un anticuerpo). La molécula biespecífica heterodimérica contendría entonces un dominio Fc que dimerizaría con una molécula homóloga, formando una molécula de tipo IgG tetramérica con tetravalencia (es decir, formada por una dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). De forma interesante, dichas moléculas tetraméricas no fueron detectadas en el medio condicionado de los sistemas de expresión recombinantes que usan los ensayos funcionales, por ejemplo, la prueba del medio condicionado para evaluar la unión inmunospecífica a los antígenos objetivo. En su lugar, sólo se detectó una molécula dimérica, que comprende monómeros que consisten en un dominio VL, un VH y un Fc, en dichos ensayos funcionales. Para probar si se cuestionaba la estabilidad de la teórica estructura tetramérica, se diseñaron polipéptidos que comprenden el dominio Fc para que comprendieran adicionalmente una región de bisagra, mientras que los polipéptidos que comprenden la cadena 'más ligera' fueron modificados para que comprendieran adicionalmente los 6 aminoácidos C terminales del dominio constante de la cadena ligera kappa humana. Cuando dichas cadenas rediseñadas 'más pesadas' y 'más ligeras' eran coexpresadas en los sistemas de expresión recombinantes, los ensayos funcionales detectaban las moléculas de diacuerpos que eran capaces de unirse inmunoespecíficamente tanto a los antígenos objetivo como a los anticuerpos anti-Fc.

### Materiales y métodos

**Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas:** se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 presentadas en el Ejemplo 6.1. La construcción 5 (la SEQ ID NO: 14) y la 6 (la SEQ ID NO: 15) fueron creadas mediante la modificación de la construcción 1 y 2, respectivamente, para que comprendieran adicionalmente un dominio Fc. La construcción 7 (la SEQ ID NO: 16) fue creada mediante la modificación de la construcción 1 para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (la SEQ ID NO: 23) en su C terminal. La construcción 8 (la SEQ ID NO: 18) fue creada mediante la modificación de la construcción 2 para que comprendiera adicionalmente una región de bisagra y un dominio Fc (que comprende la mutación V215A). Una representación esquemática de las construcciones 5-8 se muestra en la FIG. 9.

**PCR y construcción del vector de expresión:** todos los protocolos de la PCR y de la purificación del producto de la PCR fueron según 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 de HulG y/o el dominio de bisagra eran la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN de molde se amplificaron usando unos cebadores directo e inverso tales que los productos de la PCR contendrían secuencias solapantes, permitiendo que la PCR de solapamiento generara las secuencias codificantes de los productos deseados.

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

**PCR de solapamiento:** los productos iniciales de la PCR se combinaron como se describe a continuación, se amplificaron y se purificaron según se ha descrito en el ejemplo 6.1.

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la construcción 5, la SEQ ID NO: 14 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), fue amplificada mediante la combinación de los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 1 y el Fc de HulG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 66, respectivamente. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la construcción 6, la SEQ ID NO: 15 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), fue amplificada mediante la combinación de los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y el Fc de HulG y los cebadores directo e inverso SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 66, respectivamente. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la construcción 8, la SEQ ID NO: 18 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 9), fue amplificada mediante la combinación de los productos de la PCR de las amplificaciones de la construcción 2 y la bisagra HulG-Fc 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.) según se ha escrito previamente. Las construcciones que codifican el plásmido fueron diseñadas según se identifica en la Tabla 14:

**Tabla 14. Construcciones de plásmidos**

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
5	pMGX0676	hu2B6VF-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VF-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VF-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VF-hu2B6VH-hu bisagra-Fc (A215V)

**Expresión del polipéptido/diacuerpo:** se llevaron a cabo cuatro cotransfecciones por separado en células HEK-293 usando Lipofectamina 2000, según se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0674, que codifican las construcciones 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codifican las construcciones 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, que codifican las construcciones 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos plásmidos se diseñó para que diera lugar a la expresión de un diacuerpo biespecifico (CBD) de tetravalencia con una estructura de tipo IgG, inmuno-especifico tanto para el Fc $\gamma$ RIIB como para el Fc $\gamma$ RIIA. También se llevó a cabo una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codifican las construcciones 6 y 5, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado se cuantificó mediante un ELISA anti Fc de la IgG usando Fc purificado como patrón. Las concentraciones de producto en las muestras se normalizaron después sobre la base de la cuantificación, y se usaron las muestras normalizadas para el resto de los ensayos.

ELISA: se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos secretadas en el medio mediante un ELISA en sándwich, según se ha descrito, *supra*. Salvo que se indique, se usó la CD32B para recubrir la placa, es decir, como la proteína objetivo, y se usó la CD16 conjugada con HRP como la sonda.

## 5 Resultados

Se usó un ensayo de ELISA para probar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinante que comprenden las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), las construcciones 2 y 5 (pMGX667-pMGX676) y las construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para evaluar la expresión de las moléculas de diacuerpos capaces de una unión simultánea a la CD32B y a la CD16A (FIG. 10). Los datos del ELISA indicaron que la cotransfección con las construcciones 1 y 6 o la cotransfección con las construcciones 2 y 5 no consiguieron producir un producto que pudiera unirse a alguno o a ambos de los antígenos (FIG. 10, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la cotransfección de las construcciones 5 y 6 dio lugar a la secreción de un producto capaz de unirse a ambos antígenos CD32B y CD16. El último producto era un dímero de las construcciones 5 y 6, que contiene un sitio de unión para cada antígeno con la estructura representada esquemáticamente en la FIG. 11.

Con objeto de guiar la formación de una estructura heterotetramérica de tipo IgG, se unió la secuencia codificante de seis aminoácidos adicionales al C terminal de la construcción 1, generando la construcción 7 (la SEQ ID NO: 16 y mostrada esquemáticamente en la FIG. 9). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23), derivaban del extremo C terminal de la cadena ligera Kappa, y normalmente interactúan con el dominio de bisagra superior de la cadena pesada en una molécula de IgG. Después se modificó un dominio de bisagra en la construcción 6, generando la construcción 8 (la SEQ ID NO: 18 y la FIG. 9). La construcción 8 comprendía adicionalmente una mutación de aminoácido en la región de bisagra superior, A215V. Después se cotransfectaron plásmidos de expresión que codifican la construcción 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, en células HEK-293, y se expresaron según se describe.

Las moléculas de diacuerpos producidas a partir del sistema de expresión recombinante que comprende las construcciones 7 y 8 (pMGX0677 + pMGX0678), se compararon en un ensayo de ELISA para evaluar la unión de la CD32B y de la CD16A a las moléculas de diacuerpos producidas a partir de los sistemas de expresión que comprenden 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 mediante el sistema de expresión que comprende las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) resultó ser incapaz de unirse a la CD32A ni a la CD16A (la FIG. 10 y la FIG. 12). Por el contrario, el producto de la coexpresión de cualquiera de las construcciones 7 y 6 (pMGX0677 + pMGX0674) o de la coexpresión de las construcciones 7 y 8 (pMGX0677-pMGX0678) era capaz de unirse tanto a la CD32B como a la CD16 (FIG. 12). Se aprecia que la construcción 7 es análoga a la construcción 1, con la excepción de que la construcción 7 comprende la secuencia C terminal FNRGEC (la SEC ID NO: 23); y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, excepto porque la construcción 8 comprende un dominio de bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de 6 aminoácidos adicionales en el C terminal de la cadena ligera C-kappa (FNRGEC; la SEQ ID NO: 23) a la cadena no portadora del Fc, 'más ligera', ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpos tetraméricas de tipo IgG, independientemente de si la correspondiente cadena más pesada comprendía un dominio de bisagra (es decir, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, FIG. 12). La adición del dominio de bisagra al polipéptido portador del Fc 'más pesado', sin la adición de la secuencia FNRGEC (la SEQ ID NO: 23) C terminal a la correspondiente cadena 'más ligera', era aparentemente incapaz de efectuar una estabilización similar (es decir, carece de la unión por parte del producto de la cotransfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérica está representada esquemáticamente en la FIG. 13.

### 50 Efecto del orden del dominio y de los puentes de disulfuro adicionales sobre la formación del diacuerpo tetramérico de tipo IgG

Se investigó el efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas 'más ligeras' y 'más pesadas' de la molécula de diacuerpo tetramérica de tipo IgG mediante la sustitución de residuos seleccionados de las cadenas polipeptídicas por cisteínas. Los residuos adicionales de cisteína proporcionan puentes de disulfuro adicionales entre las cadenas 'más pesadas' y las 'más ligeras'. Adicionalmente, se investigó el orden del dominio sobre la actividad de unión mediante el desplazamiento del dominio Fc o del dominio de bisagra-Fc desde el extremo C terminal de la cadena polipeptídica al N terminal. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprende los puentes de disulfuro adicionales no estaba alterada con respecto a las moléculas de diacuerpos construidas previamente con dichos enlaces, la transferencia del dominio Fc o del bisagra-Fc al N terminal de la cadena polipeptídica 'más pesada' que comprende el diacuerpo sorprendentemente mejoró la afinidad de unión y/o la avidéz de la molécula biespecífica por uno o ambos de sus antígenos objetivo.

### 65 Materiales y métodos

Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para

producir versiones modificadas de las construcciones 5, 6 y 8 presentadas en el Ejemplo 6.2. La construcción 9 (la SEQ ID NO: 19) y la construcción 10 (la SEQ ID NO: 20) (mostradas ambas esquemáticamente en la FIG. 13) eran análogas a las construcciones 8 y 6, con la excepción de que el dominio Fc o el dominio de bisagra-Fc, respectivamente, se habían desplazado desde el C terminal del polipéptido hasta el N terminal. Adicionalmente, todos los dominios Fc usados eran dominios Fc de la IgG1 natural. La construcción 11, la SEQ ID NO: 21, (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 2 del Ejemplo 6.1 excepto porque el C terminal se diseñó para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (la SEQ ID NO: 23). La construcción 12, la SEQ ID NO: 22 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14), era análoga a la construcción 5 del Ejemplo 6.2 excepto porque el dominio Fc comprendía adicionalmente una región de bisagra. También, para las construcciones 11 y 12, el dominio VL de 2B6 y el dominio VH de 2B6 comprendían una única modificación de aminoácido (G105C y G44C, respectivamente) de forma que una glicina de cada dominio estaba sustituida por una cisteína.

PCR y construcción del vector de expresión: todos los protocolos de la PCR y los productos de la purificación de la PCR fueron según se ha descrito en el Ejemplo 6.1 y 6.2

PCR de solapamiento: los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron usando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y en el ejemplo 6.2.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) según se ha descrito previamente. El plásmido que codifica las construcciones se diseñó según se identifica en la Tabla 15:

**Tabla 15. Construcciones de plásmidos**

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
9	pMGX0719	Huhinge/Fc -hu3G8VL- hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc -hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-huhingeFC
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH (G/C)-FNRGEC

Expresión del polipéptido/diacuerpo: se llevaron a cabo tres cotransfecciones por separado en células HEK-293 usando Lipofectamina 2000, según se describe en la sección 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 plásmidos se diseñó para que diera lugar a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetraavalencia con una estructura de tipo IgG, inmunoespecífico tanto para el FcyRIIB como para el FcyRIIIA. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado. La cantidad de producto secretado en el medio condicionado se cuantificó mediante un ELISA anti Fc de la IgG usando Fc purificado como patrón. Las concentraciones de producto en las muestras se normalizaron después sobre la base de la cuantificación, y se usaron las muestras normalizadas para el resto de los ensayos.

ELISA: se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos secretadas en el medio mediante un ELISA en sándwich, según se ha descrito, *supra*. Salvo que se indique, se usó la CD32B para recubrir la placa, es decir, como la proteína objetivo, y se usó la CD16 conjugada con HRP como la sonda

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

**Resultados**

El medio condicionado de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 1 y 9; las construcciones 1 y 10; y las construcciones 11 y 12, se analizó mediante un análisis de SDS-PAGE (en unas condiciones no reductoras) y una inmunotransferencia Western (usando un anti-IgG como la sonda). La inmunotransferencia Western reveló que el producto de los sistemas que comprenden las construcciones 11 y 12 o los que comprenden las construcciones 9 y 1 formaba predominantemente una única especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (FIG. 14, carriles 3 y 2, respectivamente). Estos dos productos tienen puentes de disulfuro internos modificados entre las cadenas 'más ligeras' y las 'más pesadas' que comprenden el diacuerpo. Por



el contrario, la molécula sin los puentes de disulfuro internos modificados entre las cadenas 'más ligeras' y las 'más pesadas', formada por las construcciones 10 y 1, formaba al menos dos especies moleculares con unos pesos moleculares de ~ 75 y de ~ 100 kDa (FIG. 14, carril 1).

5 A pesar de los resultados de la inmunotransferencia Western, se averiguó que cada uno de los tres productos era capaz de unirse tanto a la CD32A como a la CD16 (FIG. 15). Sorprendentemente, con respecto al producto que comprende un dominio de bisagra-Fc C terminal (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en los que el dominio Fc (o el Fc-bisagra) estaba en el amino terminal de la cadena polipeptídica que contiene el Fc (es decir, la cadena 'más pesada') (las construcciones 9 + 1 y las construcciones 10 + 1) mostró un aumento en la afinidad y/o en la avidéz por uno o ambos de sus péptidos objetivo (es decir, la CD32B y/o la CD16).  
10

**Efecto del sitio de escisión interno/externo sobre el procesamiento del precursor de la poliproteína y la expresión del diacuerpo biespecífico covalente; diseño y caracterización de las porciones que comprenden el diacuerpo biespecífico de la cadena lambda y el dominio de bisagra de la IgG humana**

15 Según se describe en el presente documento, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o de la molécula de diacuerpo de la invención puede ser expresadas en forma de una molécula precursora de poliproteína individual. Se probó la capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los Ejemplos 6.1-6.3 para procesar y expresar apropiadamente un CBD funcional a partir de dicho precursor de poliproteína mediante la modificación de un ácido 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 se aisló a partir del sistema recombinante que comprende la molécula precursora de poliproteína.  
20

25 Según se analiza en el Ejemplo 6.3, se averiguó que la adición de los 6 aminoácidos C terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23) estabiliza la formación del diacuerpo — posiblemente a través de un aumento en la interacción intercatenaria entre los dominios que comprenden la SEQ ID NO: 23 y aquellos dominios que comprenden un dominio Fc o un dominio de bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción de tipo cadena lambda/Fc se probó en el CBD en el que ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Se modificó una cadena polipeptídica del diacuerpo para que comprendiera la SEQ ID NO: 23 en su C terminal; la cadena polipeptídica compañera se modificó para que comprendiera la secuencia de aminoácidos VEPKSC (la SEQ ID NO: 79), que derivaba del dominio de bisagra de una IgG. La comparación de este CBD con el formado por las construcciones 1 y 2 (del ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprende los dominios derivados del dominio de bisagra y la cadena lambda mostraba una afinidad ligeramente mayor por uno o ambos de sus epítotos objetivo.  
30

35 **Materiales y métodos**

• Construcción y diseño de las moléculas polipeptídicas: precursor de poliproteína: se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir 2 moléculas precursoras de poliproteína, representadas ambas esquemáticamente en la FIG. 17. La construcción 13 (la SEQ ID NO: 97) comprendía desde el N terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a la 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 (la SEQ ID NO: 99) (FIG. 17), comprendía desde el N terminal de la cadena polipeptídica, el dominio VL de 3G8, el dominio VH de 2.4G2 (que se une a la mCD32B), un sitio de escisión de furina, un sitio de FMD (la proteasa C3 del virus de la glosopeda), 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.  
40  
45

Se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir las versiones modificadas de las construcciones 1 y 2 presentadas en el Ejemplo 6.1. La construcción 15 (la SEQ ID NO: 101) (FIG. 17) era análoga a la construcción 1 (la SEQ ID NO: 9), presentada en ejemplo 6.1, con la excepción de que el C terminal de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (la SEQ ID NO: 23). La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la construcción 15 se proporciona en la SEQ ID NO: 102. La construcción 16 (la SEQ ID NO: 103) (FIG. 17) era análoga a la construcción 2, presentada en el Ejemplo 6.1, con la excepción de que el C terminal de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPSK (la SEQ ID NO: 79). La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la construcción 16 se proporciona en la SEQ ID NO: 104.  
50  
55

PCR y construcción del vector de expresión: todos los protocolos de la PCR y los productos de la purificación de la PCR fueron según se ha descrito en el Ejemplo 6.1 y 6.2

60 PCR de solapamiento: los productos finales se construyeron, se amplificaron y se purificaron usando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y en el ejemplo 6.2 con los cebadores apropiados.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega, Inc.) según se ha descrito previamente. El plásmido que codifica las construcciones se diseñó según se identifica en la Tabla 16:

65

Tabla 16. Construcciones de plásmidos

Construcción codificante	Denominación del plásmido	Inserto
13	pMGX0750	3G8 VL-2,4G2 VH-Furin-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6 VL-Hu3 G8 VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3 G8 VL-Hu2B6 VH-VEPKSC

*Expresión del polipéptido/diacuerpo:* se realizó una transfección y una cotransfección en células HEK-293 usando Lipofectamina 2000, según se ha descrito en la sección 6.1: individual: pMGX0750, que codifica la construcción 13; y la cotransfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codifica las construcciones 15 y 16, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogió el medio condicionado y el producto secretado se purificó por afinidad según se ha descrito.

*ELISA:* se ensayó la unión de las moléculas de diacuerpos secretadas en el medio mediante un ELISA en sándwich, según se ha descrito, *supra*. Se usó la CD32B murina para recubrir la placa, es decir, como la proteína objetivo, y se usó la CD16 conjugada con HRP como la sonda para el producto de la cotransfección de las construcciones 15 y 16. Se usó la mCD32B como la proteína objetivo, y se usó la CD16A conjugada con biotina como la sonda para el sistema recombinante que comprende la construcción 13.

## Resultados

El medio condicionado de los sistemas de expresión recombinantes que comprenden las construcciones 13 se analizó mediante un ELISA en sándwich. El ensayo de ELISA probó la especificidad de la unión del CBD por una o ambas de la mCD32B y/o la CD16 (FIG. 18). La CD32B sirvió como el antígeno objetivo, y se usó la CD16A como la sonda secundaria. La señal positiva del ELISA reveló que el CBD h2.4G2-h3G8 heterodimérico producido a partir del precursor de poliproteína tenía especificidad por ambos antígenos.

De forma análoga, el producto purificado generado mediante la cotransfección de los vectores que codifican las construcciones 15 y 16 se probó en un ensayo de ELISA y se comparó con el producto comprendido por las construcciones 1 y 2 (Ejemplo 6.1). La CD32B sirvió como el antígeno objetivo, y se usó la CD16A como la sonda secundaria. Al igual que con el producto comprendido por las construcciones 1 y 2, se averiguó que el producto de las construcciones 15 y 16 era capaz de unirse simultáneamente a la CD32B y a la CD16A. De hecho, el producto de las construcciones 15 y 16 mostró un ligero aumento en la afinidad por uno o ambos antígenos objetivo, es decir, la CD32B o la CD16A. Esto es debido quizás al aumento en la estabilidad y o en la fidelidad (con respecto a una interacción natural del dominio VH-VL) de la asociación intercatenaria proporcionada por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (la SEQ ID NO: 23) y la región de bisagra VEPKSC (la SEQ ID NO: 79), que está ausente en el producto comprendido por las construcciones 1 y 2.

Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin desviarse de su ámbito, como será evidente para los expertos en la materia. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen únicamente a modo de ejemplo, y la invención debe estar limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones anexas.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.

<120> DIACUERPOS COVALENTES Y USOS DE LOS MISMOS

<1B0> 11183-058-228

<140>

<141>

<150> 60/671.657

<151> 15-04-2005

<160> 104

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 707 152 T3

<220>  
 <223> bisagra de la IgG1 humana

5 <400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 1 5 10

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>  
 <223> bisagra de la IgG2 humana

<400> 2

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro  
 1 5 10

20 <210> 3  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>  
 <223> bisagra de la IgG3 humana

<400> 3

30

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys  
 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 Cys Pro Arg  
 50 55 60

35 <210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>  
 <223> bisagra de la IgG4 humana

<400> 4

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

45 <210> 5  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <223> dominio Fc de la IgG1 humana

<400> 5

ES 2 707 152 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  
 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  
 Tyr Lys Thr Thr 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 la IgG2 humana

10

<400> 6

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  
 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  
 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

15

ES 2 707 152 T3

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

5

<220>  
 <223> dominio Fc de la IgG3 humana

<400> 7

10

```

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
 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 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
    
```

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

15

<220>  
 <223> dominio Fc de la IgG4 humana

<400> 8

20

ES 2 707 152 T3

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  
 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 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

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

5

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 1

10

<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

5 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> conector  
 <400> 10

gly gly gly ser gly gly gly gly  
 1 5

15 <210> 11  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 2  
 <400> 11

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
25	Leu	Gly	Gly	Cys											

30 <210> 12  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 3  
 <400> 12

ES 2 707 152 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 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  
 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 de diacuerpo 4

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



ES 2 707 152 T3

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

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 5

<400> 14

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 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 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

ES 2 707 152 T3

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  
 450 455 460  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 15  
 <211> 477  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 6

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  
 370 375 380  
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

ES 2 707 152 T3

```

385          390          395          400
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
              405          410
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
              420          425
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

```

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

10 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 7

<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 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>  
 <223> Conector más el C terminal de la cadena kappa de la IgG humana

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 477  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 8

<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 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  
 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

ES 2 707 152 T3

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

5

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 9

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	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	
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

ES 2 707 152 T3

Asp 435 Thr Ala Val Tyr Tyr 440 Cys Ala Arg Asn Gly 445 Asp Ser Asp Tyr  
 450 Tyr Ser Gly Met Asp Tyr 455 Trp Gly Gln Gly Thr 460 Thr Val Thr Val Ser  
 465 Ser Leu Gly Gly Cys 470 475 480  
 485

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

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 10

<400> 20

Ala 1 Pro Glu Leu 5 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 Pro Lys Asp Thr 20 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 Val Val Asp 35 Val Ser His Glu Asp 40 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 Val Asp 50 Gly Val Glu Val His 55 Asn Ala Lys Thr Lys 60 Pro Arg Glu Glu  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 70 Arg Val Val Ser Val 75 Leu Thr Val Leu His  
 65 Gln Asp Trp Leu 85 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys 90 Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 Ala Leu Pro 100 Ala Pro Ile Glu Lys Thr 105 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 Pro Arg Glu 115 Pro Gln Val Tyr Thr 120 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 Thr Lys 130 Asn Gln Val Ser Leu 135 Thr Cys Leu Val Lys 140 Gly Phe Tyr Pro  
 Ser Asp 145 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 155 Gln Pro Glu Asn Asn  
 Tyr Lys Thr Thr 165 Pro Val Leu Asp Ser 170 Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 Tyr Ser Lys Leu 180 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 Phe Ser Cys 195 Ser Val Met His Glu 200 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 Lys Ser 210 Leu Ser Leu Ser Pro 215 Gly Lys Gly Gly 220 Ser Gly Gly Gly  
 Gly Asp 225 Ile Val Met Thr 230 Gln Ser Pro Asp Ser 235 Leu Ala Val Ser Leu  
 Gly Glu Arg Ala Thr 245 Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe  
 Asp Gly Asp Ser 260 Phe Met Asn Trp Tyr 265 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
 Pro Lys Leu 275 Leu Ile Tyr Thr 280 Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser 295 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser  
 305 Asn Glu Asp Pro Tyr 310 Thr Phe Gly Gln Gly 315 Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 Gly Gly Gly Ser 340 Gly Gly Gly Gly Gln 345 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly  
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala  
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala  
 370 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr  
 385 390 395 400

ES 2 707 152 T3

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val  
 val val Ser Thr 405 Ser Thr Ala Tyr Met 410 Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser  
 Asp Asp Thr 420 Ala Val Tyr Tyr Cys 425 Ala Arg Asn Gly Asp 430 Ser Asp Tyr  
 Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp 440 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 ser 450 Leu Gly Gly Cys 455 460 465

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

5

<220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 11

10

<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
 1 5  
 Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
 20  
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35  
 Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55  
 ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
 65 70 80  
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe  
 85 95  
 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 110  
 Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys  
 115 125  
 Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu  
 130 140  
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 145 150 160  
 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  
 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  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 225 230 240  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 245 255  
 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  
 305 310 320  
 val val Ser val Leu Thr val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 325 335  
 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

ES 2 707 152 T3

	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															

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

10 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo 12  
 <400> 22

	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
						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
						230					235					240
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
					245											

15 <210> 23  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>  
 <223> C terminal de la cadena Kappa de la IgG humana  
 <400> 23

25 Phe Asn Arg Gly Glu Cys



ES 2 707 152 T3

```

1
5
<210> 24
5 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> región variable 2B6 de la cadena pesada - CDR1

<400> 24

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

15
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

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

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

30
<210> 26
<211> 17
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> región variable 2B6 de la cadena pesada - CDR2

<400> 26

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

40
<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> región variable 3H7 de la cadena pesada - 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

50
<210> 28
<211> 12
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

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

60
<400> 28

```

ES 2 707 152 T3

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

5 <210> 29  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región variable 3H7 de la cadena pesada - CDR3  
 <400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr  
 1 5

15 <210> 30  
 <400> 30  
 000

20 <210> 31  
 <400> 31  
 000

25 <210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera - CDR1  
 <400> 32

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

35 <210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> región variable 3H7 de la cadena ligera - CDR1  
 <400> 33

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

45 <210> 34  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera - CDR2  
 <400> 34

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

60

ES 2 707 152 T3

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

5

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

<400> 35

10 Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser  
1 5

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

15

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

20

<400> 36

25 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
1 5

<210> 37  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> región variable 3H7 de la cadena ligera - CDR2

<400> 37

35 Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser  
1 5

<210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> región variable 2B6 de la cadena ligera - CDR3

45

<400> 38

50 Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr  
1 5

<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> región variable 3H7 de la cadena ligera - CDR3

<400> 39

60 Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 40

ES 2 707 152 T3

<211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena pesada

<400> 40

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20
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
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
    
```

10 <210> 41  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera - Hu2B6VL-1

20 <400> 41

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1          5          10
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
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
    
```

25 <210> 42  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera humanizada - Hu2B6VL-2

<400> 42

ES 2 707 152 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 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 2B6 de la cadena ligera humanizada - Hu2B6VL-3

<400> 43

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 Tyr Ala 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> 44  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *mus sp.*

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

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg 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 Trp 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 Val Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

30 <210> 45  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 707 152 T3

<213> Secuencia artificial

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

5 <400> 45

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn  
1 5

10 <210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 46

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn  
1 5

20 <210> 47  
<211> 9  
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 47

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr  
1 5

35 <210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 48

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr  
1 5

45 <210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 49

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

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr  
1 5

60 <210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 707 152 T3

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

5 <400> 50

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr  
 1 5

10 <210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 51

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn  
 1 5

20 <210> 52  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 52

30 Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn  
 1 5

35 <210> 53  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 53

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr  
 1 5

45 <210> 54  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIB

<400> 54

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr  
 1 5

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

60

ES 2 707 152 T3

<220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIb

<400> 55

5 Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr  
 1 5

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

<220>  
 <223> sitio de unión a la IgG del Fc-gamma-receptor RIIb

15 <400> 56

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr  
 1 5

20 <210> 57  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> cebador Lgh32IF

<400> 57

30 cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

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

35 <220>  
 <223> Lgh318R cebador

40 <400> 58

gcctccgcct ccggatccgc ctctttgat ctccacctg gtcctc 47

45 <210> 59  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador Lgh319F

<400> 59

ggaggcggat ccggaggcgg aggccagggtt cagctggtgc agtctgg 47

55 <210> 60  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador Lgh320R



ES 2 707 152 T3

	<400> 60		
	<b>tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg</b>		<b>43</b>
5	<210> 61 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> cebador Lgh315R		
	<400> 61		
15	<b>gcctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctcaagcttg gtcccc</b>		<b>46</b>
20	<210> 62 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> cebador Lgh316F		
25	<400> 62		
	<b>ggaggcggat ccggaggcgg aggccagggt accctgagag agtctggc</b>		<b>48</b>
30	<210> 63 <211> 47 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> cebador Lgh317R		
	<400> 63		
40	<b>tttgaattcc tagcagcctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc</b>		<b>47</b>
45	<210> 64 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> cebador Lgh339R		
50	<400> 64		
	<b>ctcaacgcag cctcccagtg agctcac</b>		<b>27</b>
55	<210> 65 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> cebador Lgh340R		
	<400> 65		
	<b>aacgcagcct ccagtgagg agacggtgac c</b>		<b>31</b>
65	<210> 66		

ES 2 707 152 T3

<211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador Lgh366R  
 <400> 66  
 10 **tttgaattct atttaccgag agacagg** 27  
 <210> 67  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador Lgh367F  
 20 <400> 67  
**ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac** 33  
 <210> 68  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador Lgh368R  
 30 <400> 68  
**gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag** 33  
 <210> 69  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador Lgh369R  
 <400> 69  
 45 **tttgaattct aacactctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac** 50  
 <210> 70  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> región variable de la cadena pesada (Hu3G8VH-1) anti-CD16A humanizada  
 55 <400> 70

ES 2 707 152 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
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

```

5 <210> 71  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región variable de la cadena pesada (Hu3G8VH-5) anti-CD16A humanizada  
 <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
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

```

15 <210> 72  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> región variable de la cadena pesada (Hu3G8VH-22) anti-CD16A humanizada  
 <400> 72

ES 2 707 152 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
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
          80          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 (Hu3G8VL-1) anti-CD16A humanizada

<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 (Hu3G8VL-43) anti-CD16A humanizada

<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
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
25          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
    
```

<210> 75

ES 2 707 152 T3

<211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> región variable de la cadena ligera (Hu3G8VL-22) anti-CD16A humanizada

<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
  
```

10

<210> 76  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> secuencia de ADN del conector (SEQ ID NO. 10)

20 <400> 76

**ggaggcggat ccggaggcgg aggc** 24

25 <210> 77  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>  
 <223> secuencia de ADN del C terminal de la cadena Kappa de la IgG humana

<400> 77

**ttcaacaggg gagagtgt** 18

35 <210> 78  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Conector más el C terminal de la cadena Kappa de la IgG humana

<400> 78

45 **ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt** 30

50 <210> 79  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 707 152 T3

<223> dominio de bisagra de la IgG humana

<400> 79

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

5

<210> 80

<211> 18

<212> ADN

10

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> dominio de bisagra de la IgG humana

15

<400> 80

**gttgagccca aatcttgt**

18

<210> 81

20

<211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25

<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													

30

<210> 82

<211> 354

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> dominio VH del anticuerpo 3G8

<400> 82

40

caggttacc	tgaaagagtc	tggccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagctctg	60
actgttctt	tctctgggtt	tcaactgagg	acttctggta	tgggtgtagg	ctggattcgt	120
cagccttcag	ggaagggctt	agagtggctg	gcacacattt	ggtgggatga	tgacaagcgc	180
tataatccag	cctgaagag	ccgactgaca	atctccaagg	atacctccag	caaccaggta	240
ttctcaaaa	tcgccagtgt	ggacactgca	gatactgcca	catactactg	tgctcaaata	300
aacccgcct	ggtttgctta	ctggggccaa	gggactctgg	tcactgtgag	ctca	354

<210> 83

<211> 354

<212> ADN

45

ES 2 707 152 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 83

```

caggttacc t g a g a g a g t c   t g g c c c t g c g   c t g g t g a a g c   c c a c a c a g a c   c c t c a c a c t g   60
a c t t g t a c c t   t c t c t g g g t t   t t c a c t g a g c   a c t t c t g g t a   t g g g t g t a g g   c t g g a t t c g t   120
c a g c c t c c c g   g g a a g g c t c t   a g a g t g g c t g   g c a c a c a t t t   g g t g g g a t g a   t g a c a a g c g c   180
t a t a a t c c a g   c c c t g a a g a g   c c g a c t g a c a   a t c t c c a a g g   a t a c c t c c a a   a a a c c a g g t a   240
g t c c t c a c a a   t g a c c a a c a t   g g a c c c t g t g   g a t a c t g c c a   c a t a c t a c t g   t g c t c a a a t a   300
a a c c c c g c c t   g g t t t g e t t a   c t g g g g c c a a   g g g a c t c t g g   t c a c t g t g a g   c t c a   354
    
```

10

<210> 84

<211> 111

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> dominio VL del anticuerpo 3G8

<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
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
    
```

20

<210> 85

<211> 333

<212> ADN

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> dominio VL del anticuerpo 3G8

30

<4on> Rt;

```

g a c a c t g t g c   t g a c c c a a t c   t c c a g c t t c t   t t g g c t g t g t   c t c t a g g g c a   g a g g g c c a c c   60
a t c t c c t g c a   a g g c c a g c c a   a a g t g t t g a t   t t t g a t g g t g   a t a g t t t t a t   g a a c t g g t a c   120
c a a c a g a a a c   c a g g a c a g c c   a c c c a a a c t c   c t c a t c t a t a   c t a c a t c c a a   t c t a g a a t c t   180
g g g a t c c c a g   c c a g g t t t a g   t g c c a g t g g g   t c t g g g a c a g   a c t t c a c c c t   c a a c a t c c a t   240
c c t g t g g a g g   a g g a g g a t a c   t g c a a c c t a t   t a c t g t c a g c   a a a g t a a t g a   g g a t c c g t a c   300
a c g t t c g g a g   g g g g g a c c a a   g c t g g a a a t a   a a a   333
    
```

35

<210> 86

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40

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

<400> 86

ES 2 707 152 T3

```

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggg atagttttat gaactgggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcactata ctacatccaa tctagaatct 180
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caccatcagc 240
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaa 333

```

5  
 <210> 87  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena pesada humanizada

<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

```

15  
 <210> 88  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena pesada humanizada

<400> 88

```

caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta caccittacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tccaaattac 180
aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300
gattccgatt attactctgg tatggactac tgggggcaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

```

25  
 <210> 89  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera humanizada

35  
 <400> 89



ES 2 707 152 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
          100          105          110

```

5 <210> 90  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> región variable 2B6 de la cadena ligera humanizada

<400> 90

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
ttcacctgca ggaccagtc gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtcct caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

15 <210> 91  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sitio de reconocimiento de la escisión de la trombina

<400> 91

```

Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1           5

```

25 <210> 92  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sitio de reconocimiento de la escisión del Factor Xa

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> xaa = Glu o Asp

40 <400> 92

```

Ile Xaa Gly Arg
 1

```

45 <210> 93  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 707 152 T3

<220>  
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de la enterocinasa

5 <400> 93

Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 94  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sitio de reconocimiento de la escisión de furina

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2, 3  
<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <400> 94

Arg Xaa Xaa Arg  
1

25 <210> 95  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> sitio de reconocimiento preferido de la escisión de la furina

<220>

35 <221> VARIANTE  
<222> 2  
<223> Xaa = cualquier aminoácido

40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> Xaa = Lys o Arg

45 <400> 95

Arg Xaa Xaa Arg  
1

<210> 96  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sitio de reconocimiento de la escisión del AcTEV

<400> 96

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly  
1 5

60 <210> 97  
<211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> precursor de poliproteína del diacuerpo covalente (Construcción 13)

<400> 97

```

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1      5      10
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

```

10

ES 2 707 152 T3

				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	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>

<223> precursor de poliproteína del diacuerpo covalente (secuencia de ADN de la SEQ ID NO. 97)

10

<400> 98

```

gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat ttgatgggtg atagtittat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaacct ctcattata ctacatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

```

ES 2 707 152 T3

```

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360
gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtcctt gaaactctcg 420
tgtgcagcct caggattcac ttfcagtgcac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480
acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540
gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600
caaatggaca gtctgaggct tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660
ggaataccta cagggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag ttfcagtcac tgtctcctca 720
ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgaccagtc tccatctaata 780
cttgctgcct ctccctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840
aagtatttag cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat 900
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960
ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactctatta ctgtcaacag 1020
cattatgaat atccagccac gttcggttct gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080
tccggaggcg gaggccaggt taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140
cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt 1200
gtaggctgga ttcgtcagcc ttcaggggag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260
gatgatgaca agcgtataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320
tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380
tactgtgctc aaataaacc cgcttgggtt gcttactggg gccaaaggac tctggtcact 1440
gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

```

<210> 99  
 <211> 511  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> precursor de poliproteína del diacuerpo covalente (Construcción 14)

10

<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
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  
 385 390 395 400  
 Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe  
 405 410 415  
 Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser  
 420 425 430  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys  
 435 440 445  
 Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr  
 450 455 460  
 Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp  
 465 470 475 480  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr  
 485 490 495  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys  
 500 505 510

5 <210> 100  
 <211> 1536  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> precursor de poliproteína del diacuerpo covalente (secuencia de ADN de la SEQ ID NO. 99)

<400> 100

gacactgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat ttfgatggg atagttttat gaactgggtac 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 gaaggctcct gaaactctcg 420  
 tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac 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 cagggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720  
 ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780  
 ctgctgaagc tggcgggaga cgtggagagc aaccccggcc ccgatgtcca gatgaccag 840  
 tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900  
 gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960  
 cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatc ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020  
 tctggtacag atttcaactc caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080  
 tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcgggt ctgggaccaa gctggagatc 1140  
 aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag gttaccctga aagagtctgg ccctgggata 1200  
 ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggtttc actgaggact 1260  
 tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcagggg agggcttaga gtggctgga 1320  
 cacatttggg gggatgatga caagcgtatc aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380  
 tccaaggata cctccagcaa ccagggtatc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440  
 actgccacat actactgtgc tcaaataaac cccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500  
 actctgggtca ctgtgagctc actgggaggc tgctag 1536

15 <210> 101  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 707 152 T3

<220>  
<223> Construcción de diacuerpo (Construcción 15)

5 <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
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 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

```

<210> 102  
<211> 720  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Construcción de diacuerpo (secuencia de ADN de la SEQ ID NO. 101)

15

<400> 102

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca 120
gatcagtcct caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccacatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttaccctca ccatcaatag cctggaagct 240
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcggga 300
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcggg tccggaggcg gaggccaggt taccctgaga 360
gagtctggcc ctgctgctggg gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct 420
gggtttcac tgagcactc tgggatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tcccgggaag 480
gctctagagt ggctggcaca catttgggtg gatgatgaca agcgtataa tccagccctg 540
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc 600
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctgggtt 660
gcttactggg gcccaaggac tctggtcact gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

```

20

<210> 103  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Construcción de diacuerpo (Construcción 16)

ES 2 707 152 T3

<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

5 <210> 104  
 <211> 741  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción de diacuerpo (secuencia de ADN de la SEQ ID NO. 103)

<400> 104

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60  
 atcaactgca aggccagcca aagtgttgat ttgatgggtg atagtittat gaactggtac 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaactc ctcactata ctacatccaa tctagaatct 180  
 ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240  
 agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300  
 acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag 360  
 gtfcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggctccc 420  
 tgcaaggctt ctggttacac ctttaccac tactggatac actgggtgcg acaggcccct 480  
 ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat 540  
 aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg 600  
 gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgCgag aaacgggtgat 660  
 tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaagggg ccacggtcac cgtctcctca 720  
 gttgagccca aatcttgta g 741

15



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de diacuerpo que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en la que:
- (a) dicha primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección desde N terminal hacia C terminal:
- 10 (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítipo,
- (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo, y
- 15 (hi) un tercer dominio que comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (la SEQ ID NO: 23), la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A de las mismas que tiene la secuencia AEPKSC (residuos de aminoácidos 245-350 de SEQ ID NO: 18); y en la que dicho primer dominio y segundo dominio están unidos covalentemente entre sí mediante un conector peptídico de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de aminoácidos, de forma que el primer dominio y el segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo; y
- (b) dicha segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección desde N terminal hacia C terminal:
- 20 (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2)
- (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de la cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y
- 25 (iii) un sexto dominio que comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A de las mismas que tiene la secuencia AEPKSC (residuos de aminoácidos 245-350 de SEQ ID NO: 18);
- y en la que:
- (1) cuando dicho tercer dominio comprende dicha secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23), dicho sexto dominio comprende dicha secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A de la misma, y cuando dicho tercer dominio comprende dicha secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A de la misma, dicho sexto dominio comprende dicha secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23);
- 30 (2) dicho cuarto dominio y quinto dominio están unidos covalentemente entre sí mediante un péptido de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos de aminoácidos, de forma que el cuarto dominio y el quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión del epítipo;
- 35 (3) dicha primera cadena polipeptídica y dicha segunda cadena polipeptídica están unidas covalentemente a través de un puente de disulfuro entre dicho tercer dominio y dicho sexto dominio;
- (4) dicho primer dominio y dicho quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1) (VH1) que se une a dicho primer epítipo;
- 40 (5) dicho segundo dominio y dicho cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2) (VH2) que se une al segundo epítipo; y
- (6) dicho primer y segundo epítipo son diferentes;
- y en la que la molécula de diacuerpo es capaz de unirse simultáneamente al primer y al segundo epítipo.
- 45 2. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho tercer dominio y/o dicho sexto dominio comprenden adicionalmente un dominio de bisagra.
3. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho tercer dominio y/o dicho sexto dominio comprenden adicionalmente un dominio Fc.
- 50 4. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho tercer dominio y/o dicho sexto dominio comprenden adicionalmente un dominio de bisagra y un dominio Fc.
5. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho tercer dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23).
- 55 6. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que dicho tercer dominio comprende la secuencia VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A que tiene la secuencia AEPKSC (residuos de aminoácidos 245-350 de SEQ ID NO: 18).
- 60 7. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que (i) dicho tercer dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y dicho sexto dominio comprende la secuencia VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A que tiene la secuencia AEPKSC (residuos de aminoácidos 245-350 de SEQ ID NO: 18) y un dominio Fc; o (ii) dicho tercer dominio comprende la secuencia VEPKSC (SEQ ID NO: 79) o la mutación V215A que tiene la secuencia AEPKSC (residuos de aminoácidos 245-350 de SEQ ID NO: 18) y un dominio Fc, y dicho sexto dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23).
- 65

8. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que (i) dicho tercer dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y dicho sexto dominio comprende un dominio de bisagra; o (ii) dicho tercer dominio comprende un dominio de bisagra y dicho sexto dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23).
- 5 9. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en la que (i) dicho tercer dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) y dicho sexto dominio comprende un dominio de bisagra y un dominio Fc; o (ii) dicho tercer dominio comprende un dominio de bisagra y un dominio Fc, y dicho sexto dominio comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23).
- 10 10. La molécula de diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 9, en la que el dominio Fc es un dominio Fc humano.
11. La molécula de diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la primera inmunoglobulina o la segunda inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana o humanizada, inmunoglobulina humana o humanizada que es una IgA, una IgE, una IgD, una IgG o una IgM.
- 15 12. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 11, en la que la inmunoglobulina humana o humanizada es una IgG, IgG que se selecciona entre la lista que consiste en la IgG1, la IgG2, la IgG3 y la IgG4.
- 20 13. La molécula de diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que al menos un sitio de unión del epítipo es específico para un receptor FcγRI, FcγRII o FcγRIII.
14. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 13, en la que el receptor Fcγ es un receptor FcγRIII, receptor FcγRIII que es un receptor FcγRIIIA (CD16A) o un receptor FcγRIIIB (CD16B).
- 25 15. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 14, en la que el receptor FcγRIII es un receptor FcγRIIIA (CD16A).
16. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 15, en la que el receptor Fcγ es un receptor FcγRII, receptor FcγRII que es un receptor FcγRIIA (CD32A) o un receptor FcγRIIB (CD32B).
- 30 17. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 16, en la que el receptor FcγRII es el receptor FcγRIIB (CD32B).
18. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el primer y el segundo epítipo están en antígenos diferentes.
- 35 19. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el primer y el segundo epítipo están en células diferentes.
20. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que al menos un sitio de unión del epítipo es específico para un antígeno patógeno, o para un oncoantígeno.
- 40 21. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 13, en la que dicha molécula de diacuerpo tiene un sitio de unión del epítipo específico para la CD32B y un sitio de unión del epítipo específico para la CD16A.
- 45 22. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que al menos un sitio de unión del epítipo es específico para una toxina o un fármaco.
23. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4, o 7 a 22, en la que dicha molécula de diacuerpo es un dímero, comprendiendo dicho dímero:
- 50 (a) un primer monómero que comprende un conjunto de dicha primera cadena polipeptídica y dicha segunda cadena polipeptídica; y  
(b) un segundo monómero que comprende un conjunto de dicha primera cadena polipeptídica y dicha segunda cadena polipeptídica;
- 55 en la que dicho primer y segundo monómero están unidos covalentemente a través de al menos un puente de disulfuro entre al menos un residuo de cisteína en el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica de cada monómero.
24. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.
- 60 25. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 24.
- 65 26. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno caracterizado por dicho antígeno patógeno o dicho oncoantígeno.

27. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para su uso como un producto farmacéutico, en la que el primer epítipo es expresado en un tipo de célula diferente que el segundo epítipo, de forma que el diacuerpo puede juntar las dos células entre sí.

5

28. La molécula de diacuerpo para su uso según la reivindicación 26, en la que dicha enfermedad o trastorno es cáncer o una enfermedad infecciosa.

```

216 +-----+-----+-----+-----+-----+
      226
E P K S C D - - K T H T C P P - - - - - I G G 1
E R K C C V - - E - - C P P - - - - - - I G G 2
E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P I G G 3
E S K Y G P - - P - - C P S - - - - - - I G G 4

      230
- - - - - C P
- - - - - C P
P P C P R C P E P K S C D T P P C P R C P
- - - - - C P

```

FIG. 1A

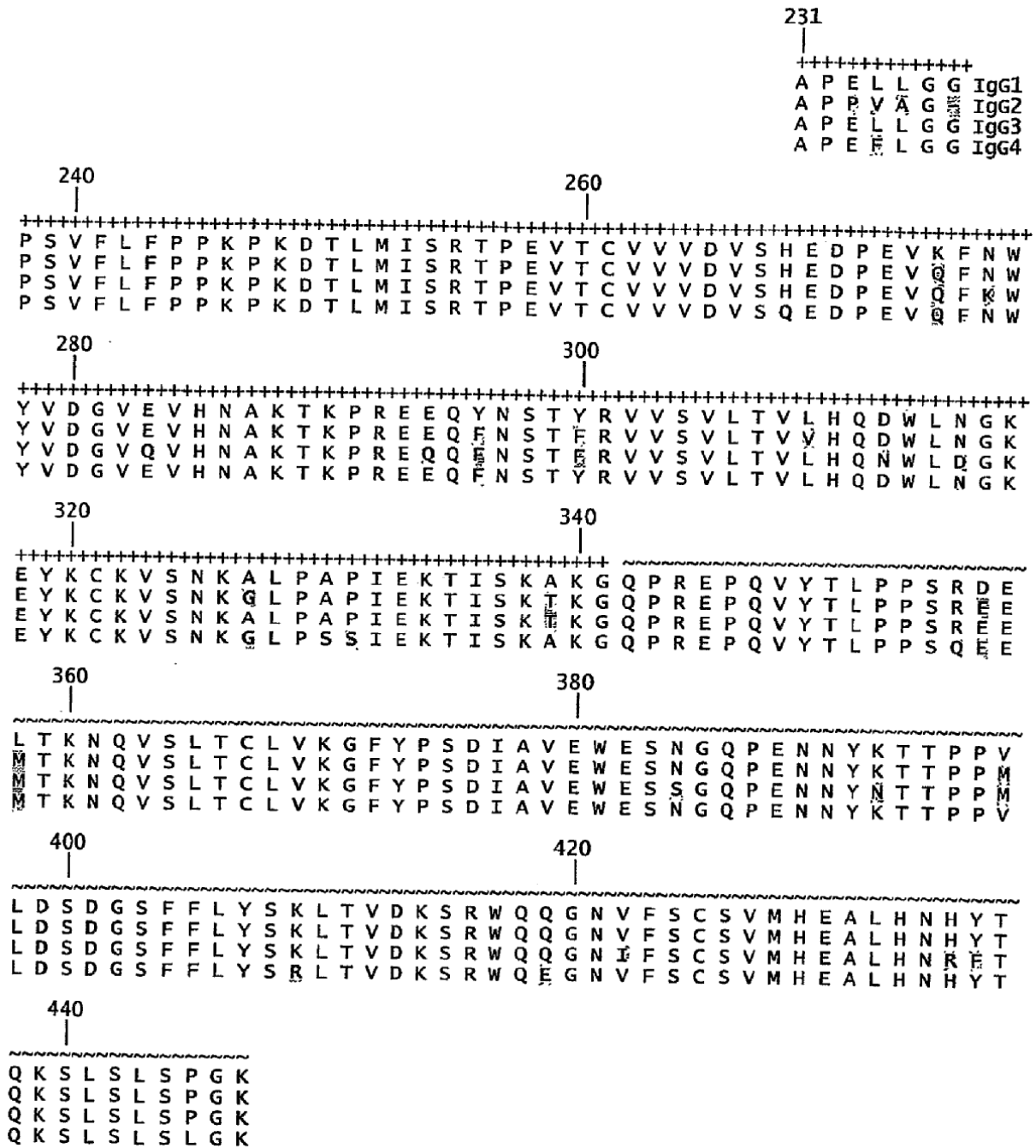
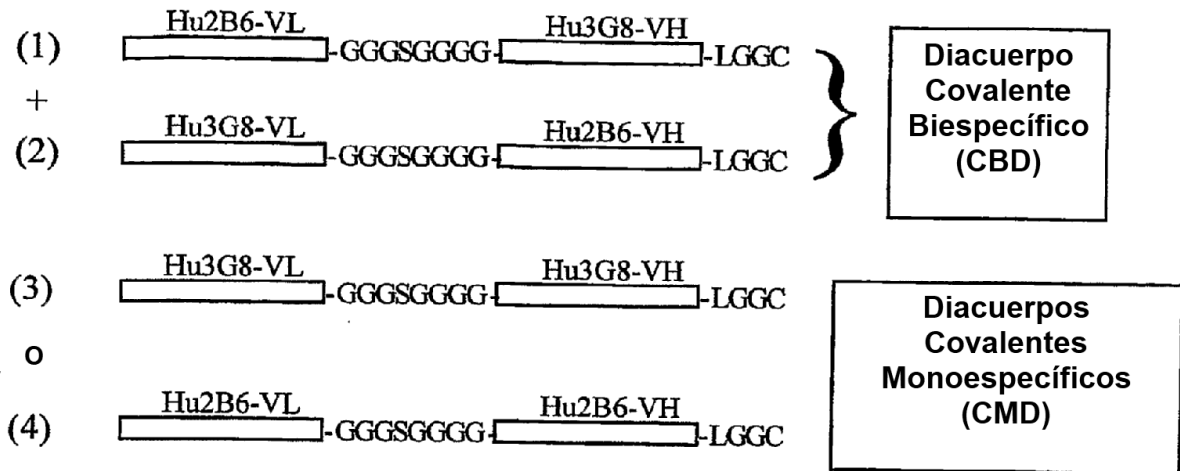
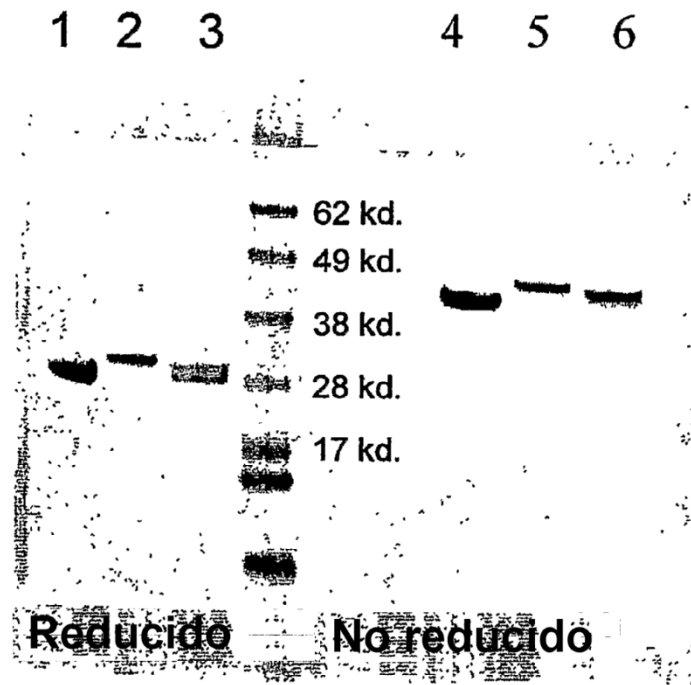


FIG. 1B



**FIG. 2**



**FIG. 3**

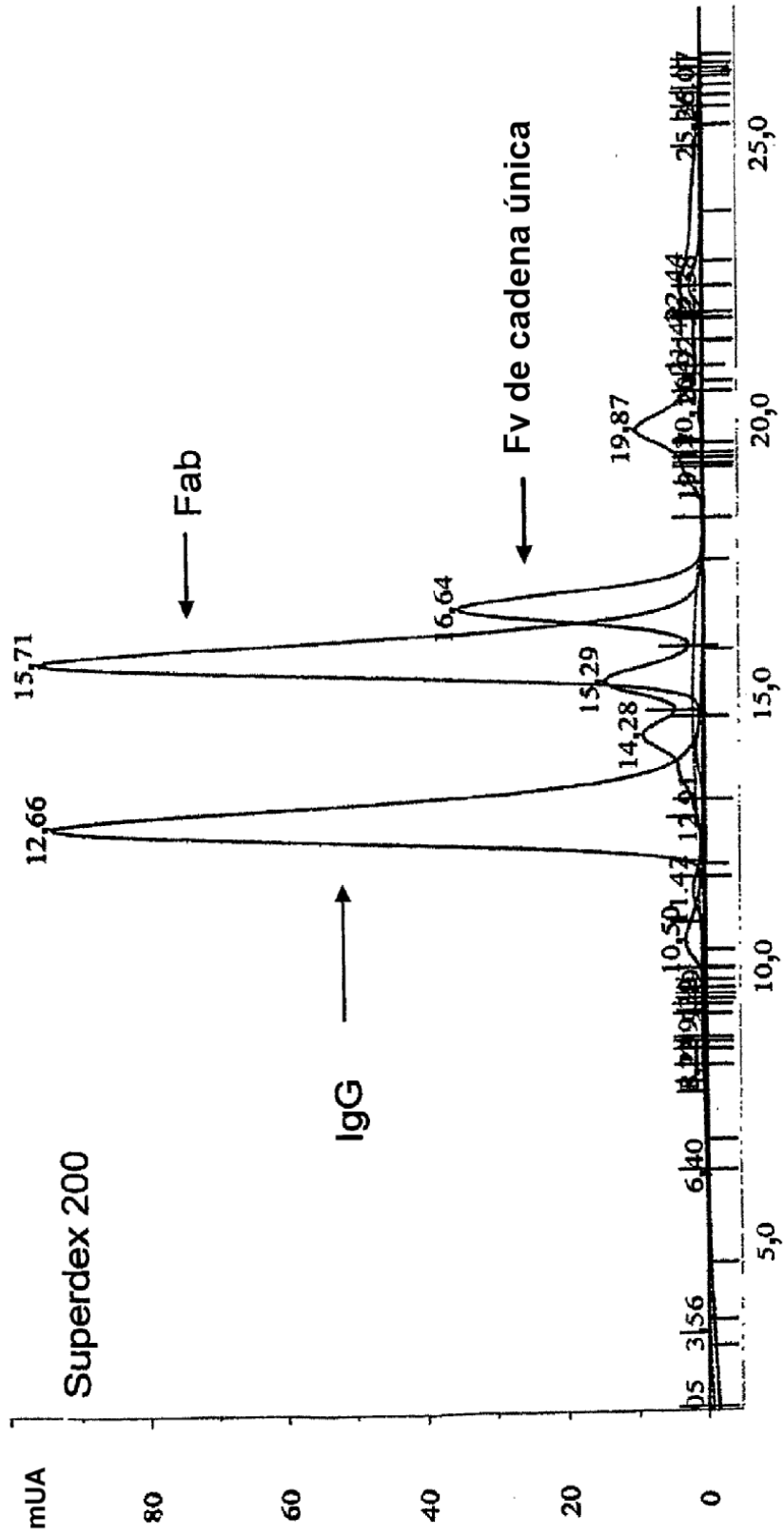


FIG. 4A



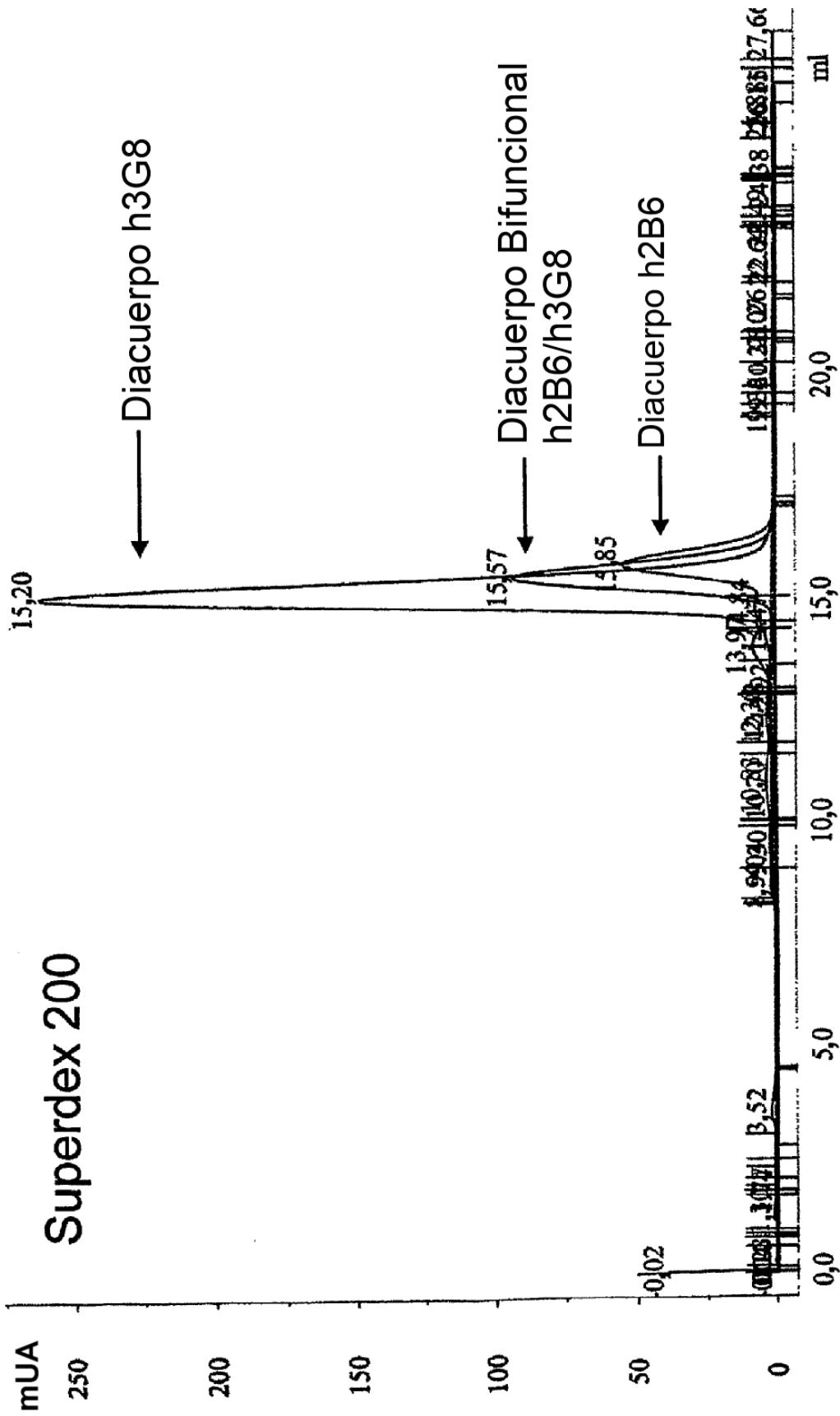
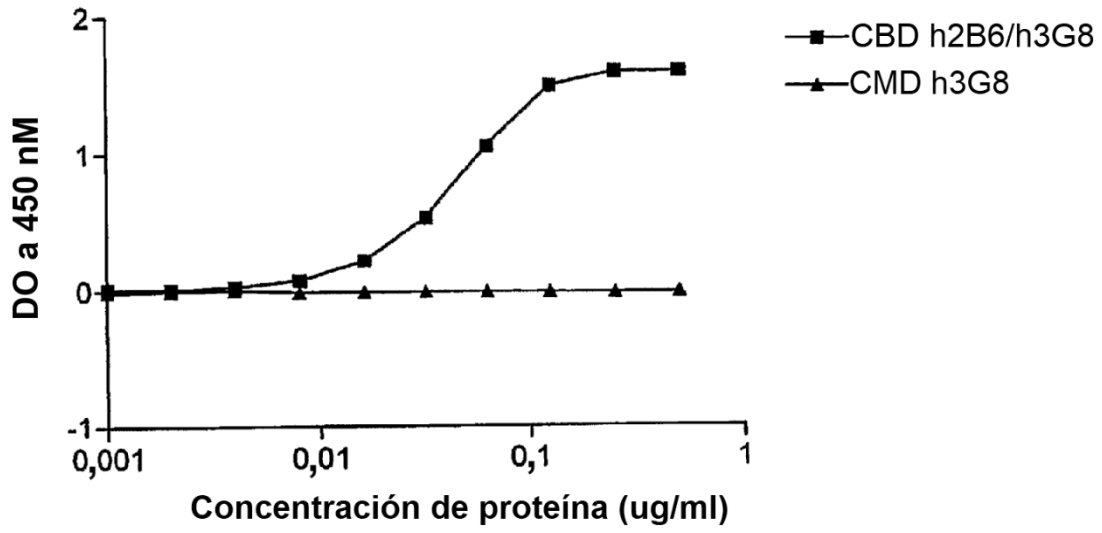
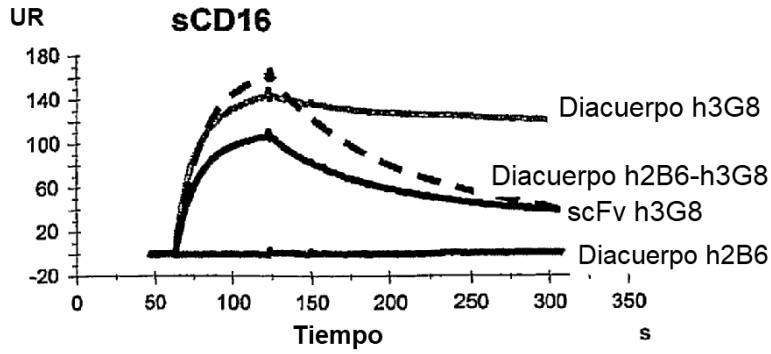


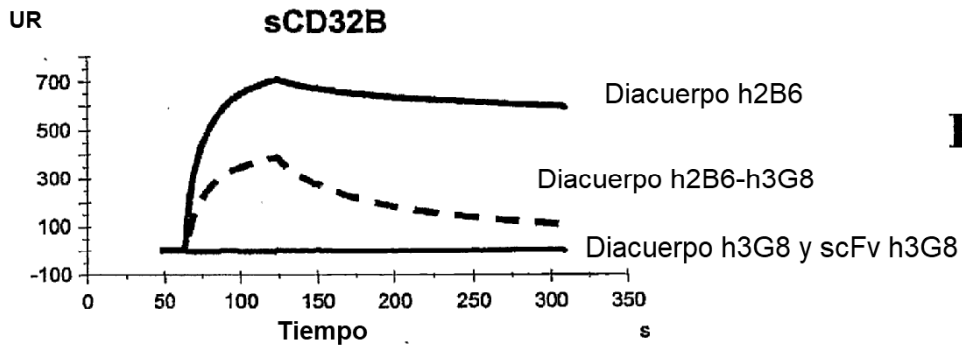
FIG. 4B



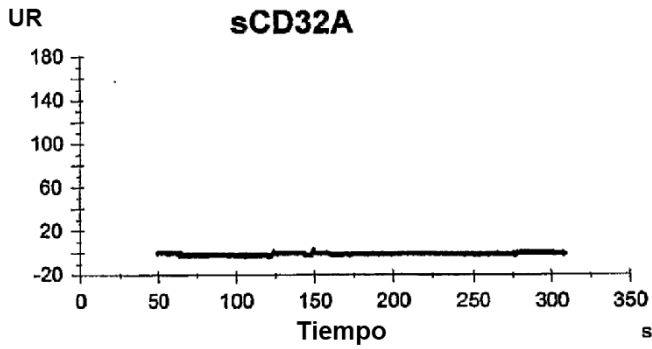
**FIG. 5**



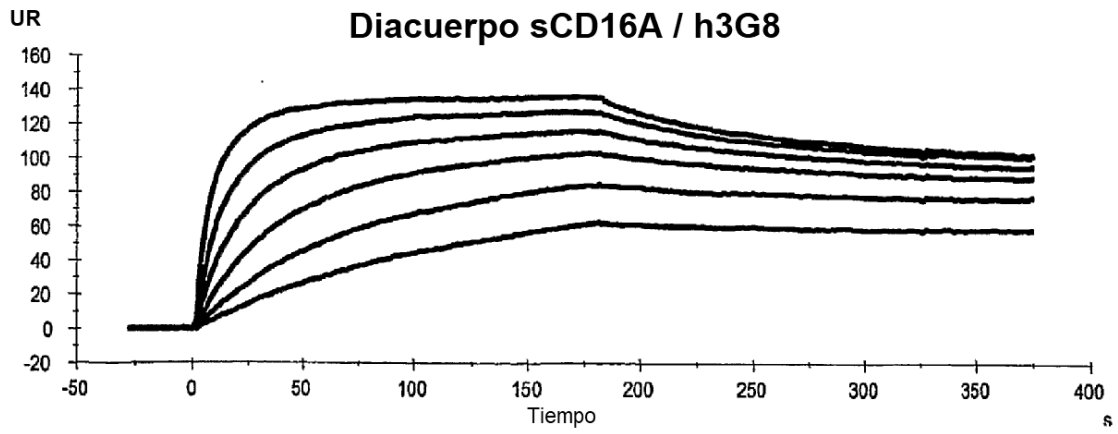
**FIG. 6A**



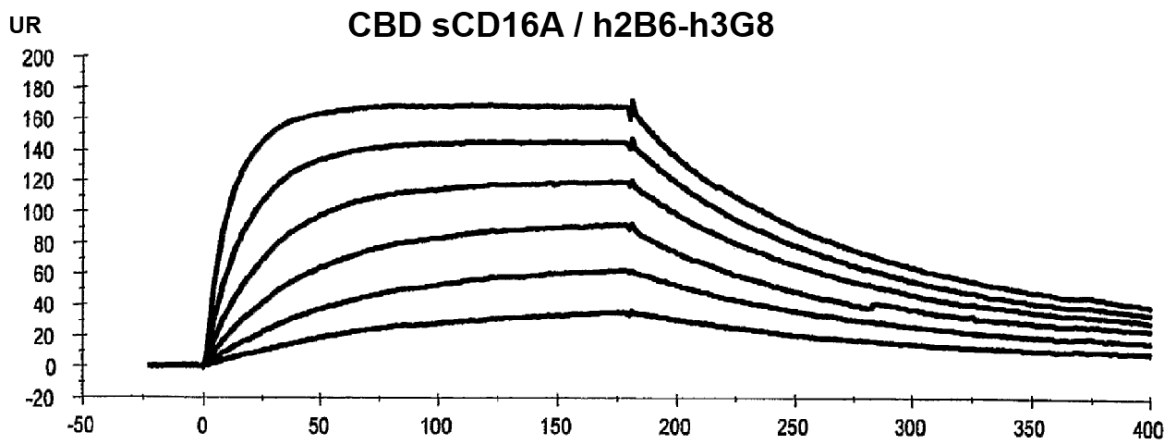
**FIG. 6B**



**FIG. 6C**



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**

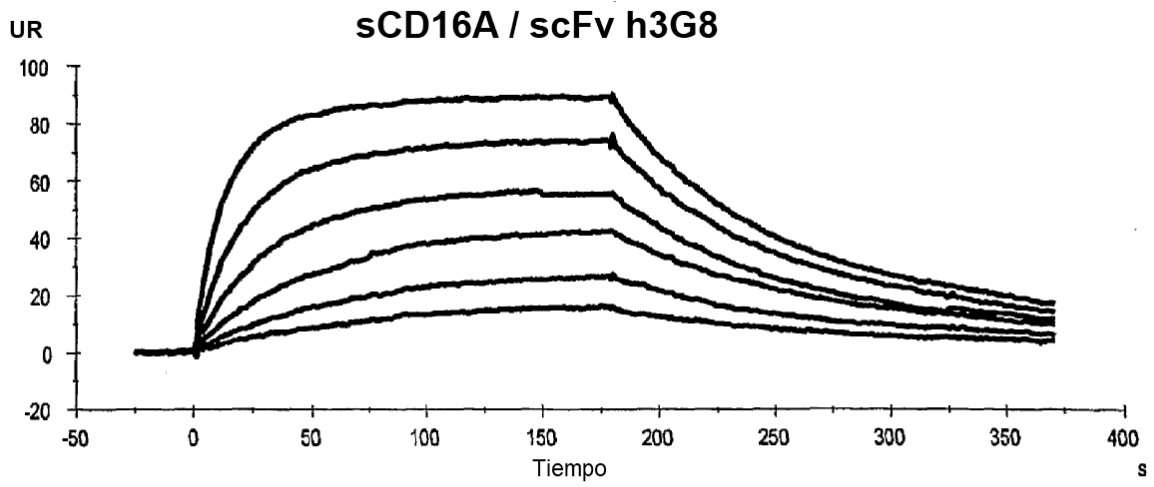


FIG. 7C

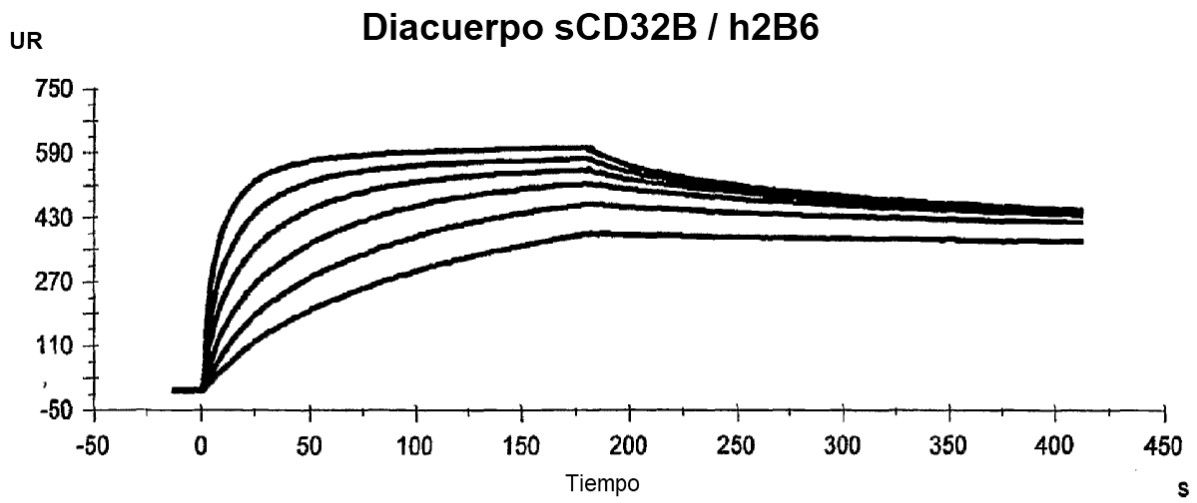
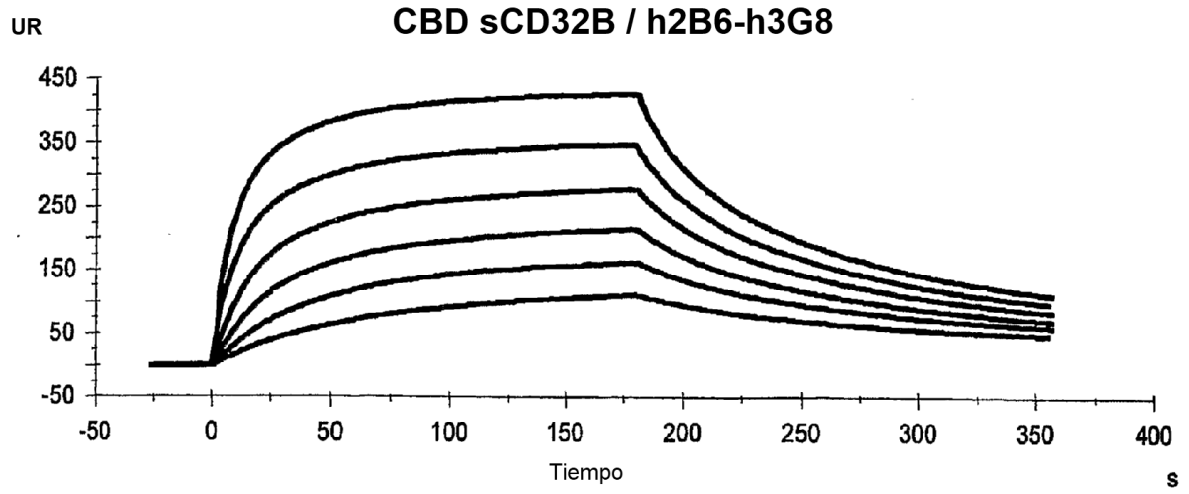
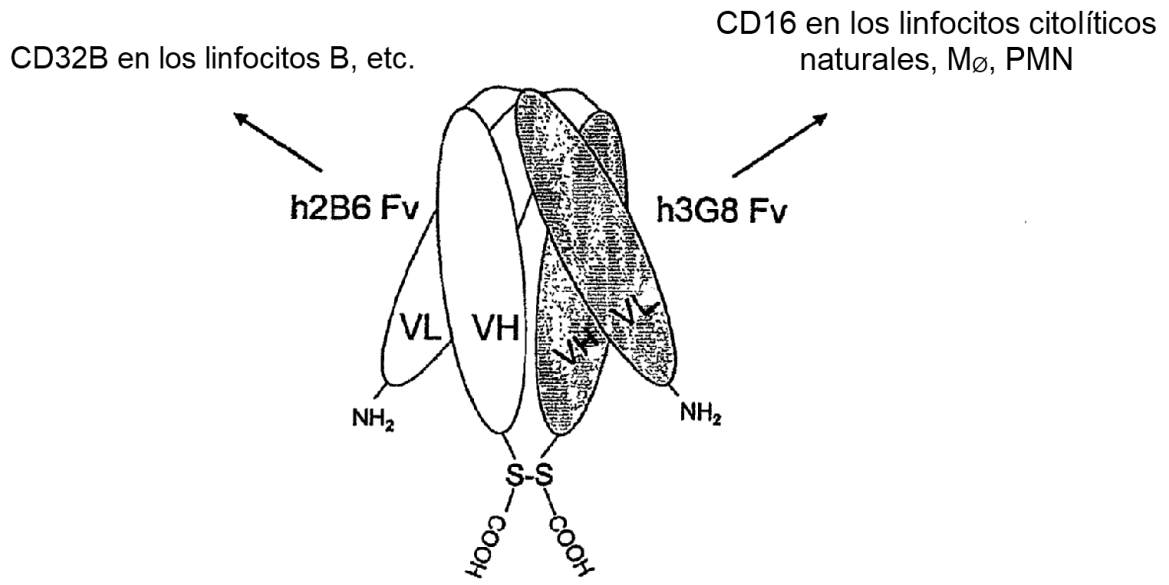


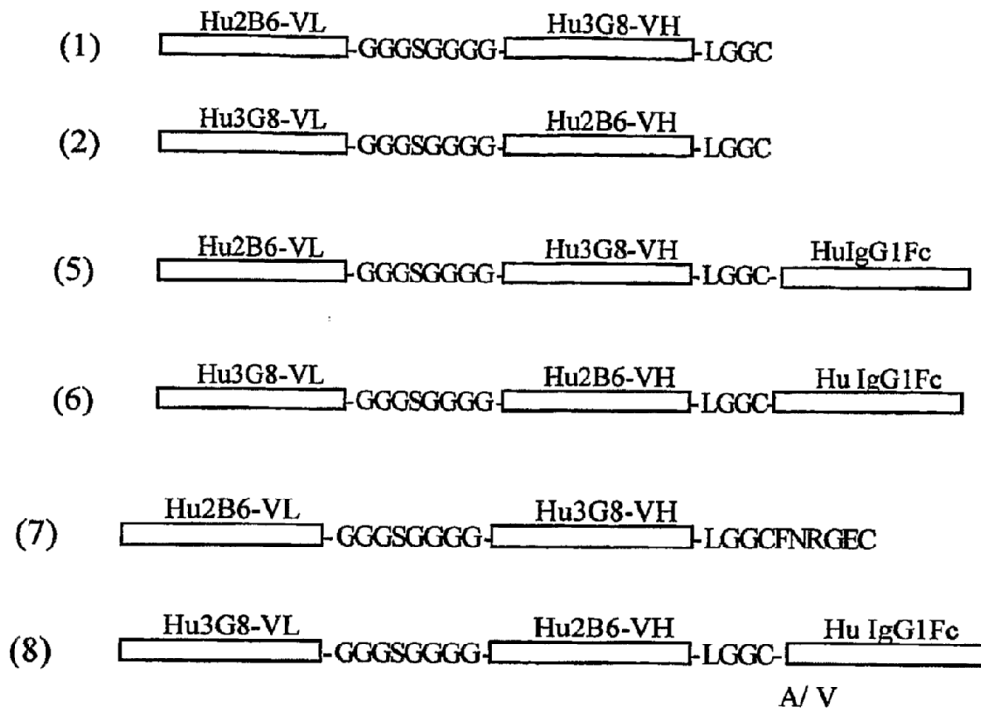
FIG. 7D



**FIG. 7E**

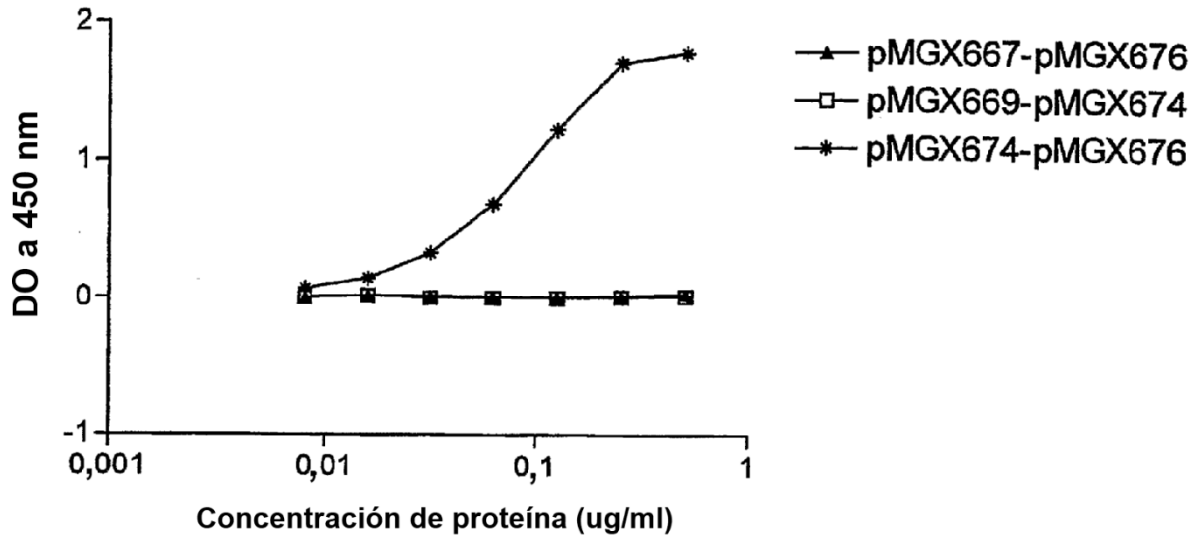


**FIG. 8**



**FIG. 9**





**FIG. 10**

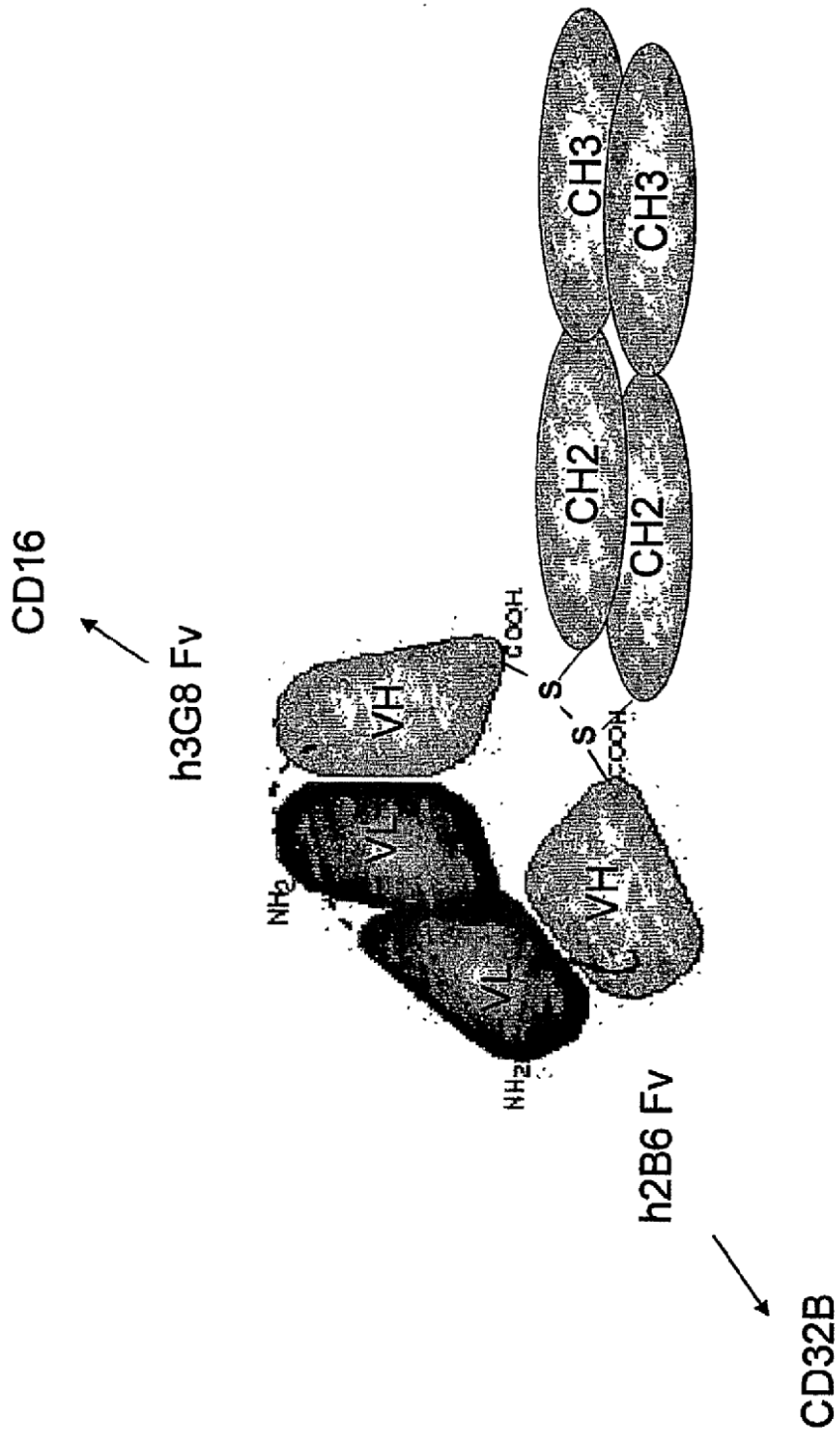
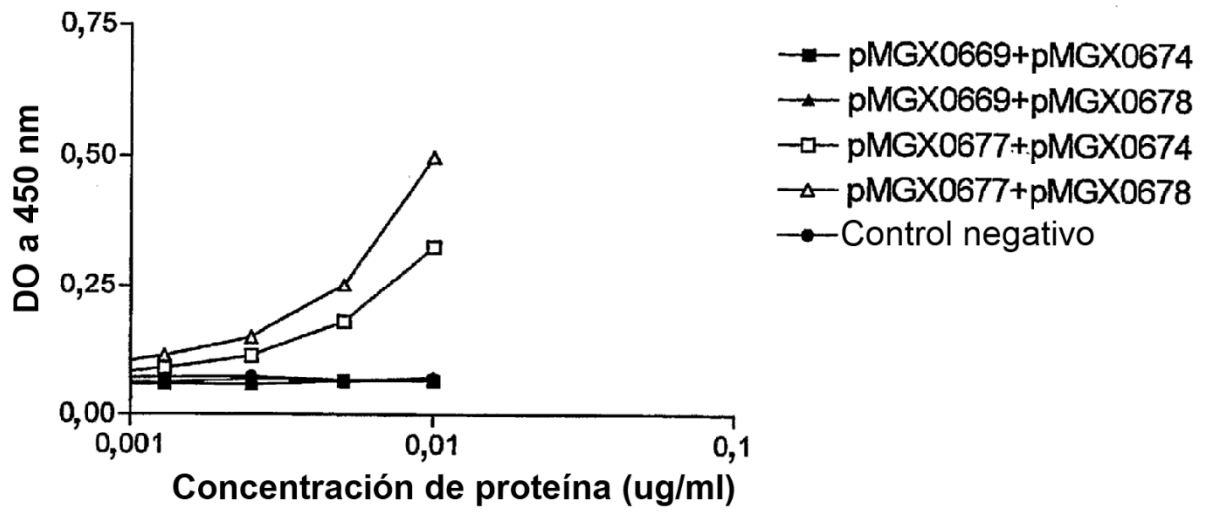
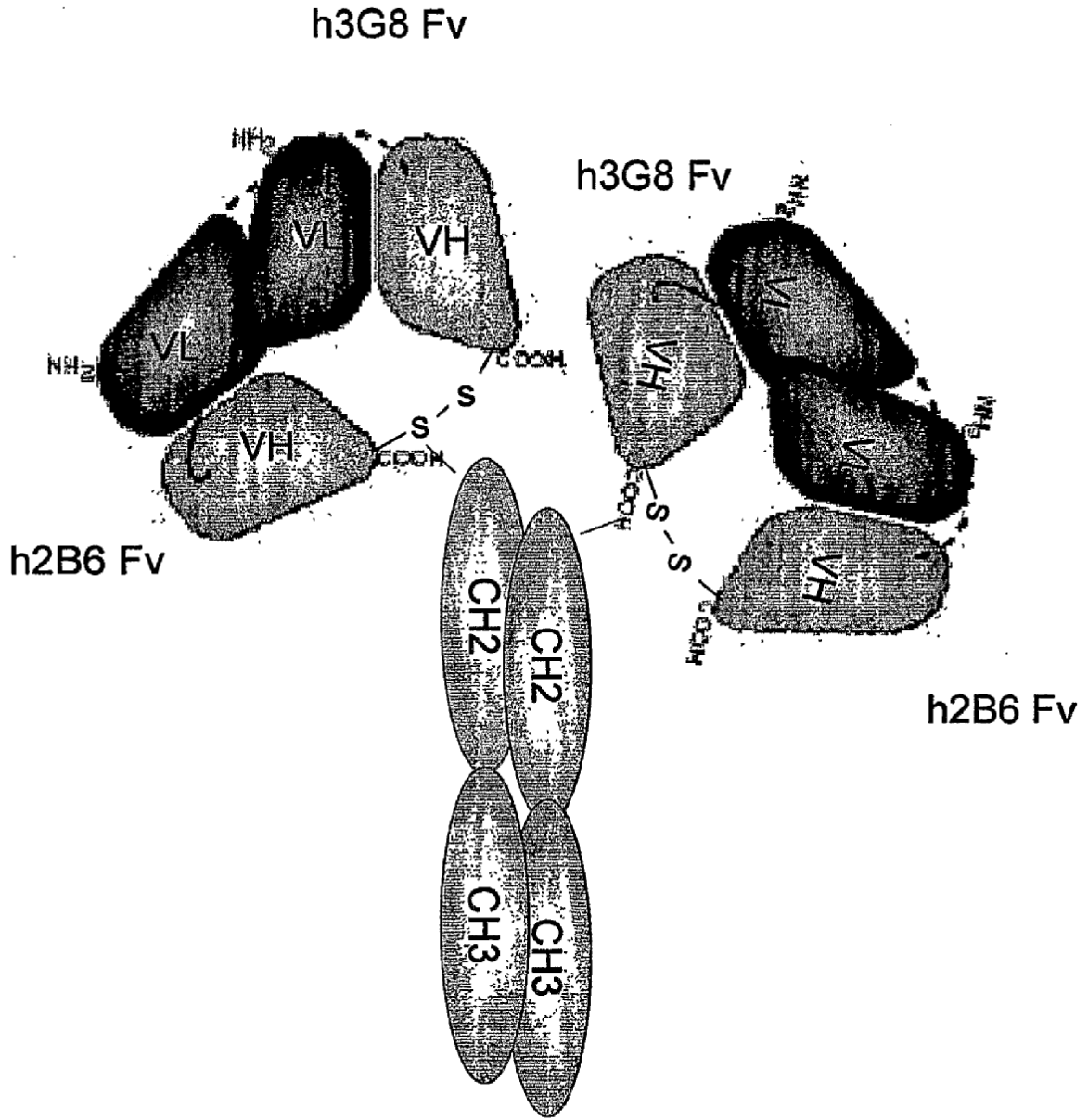


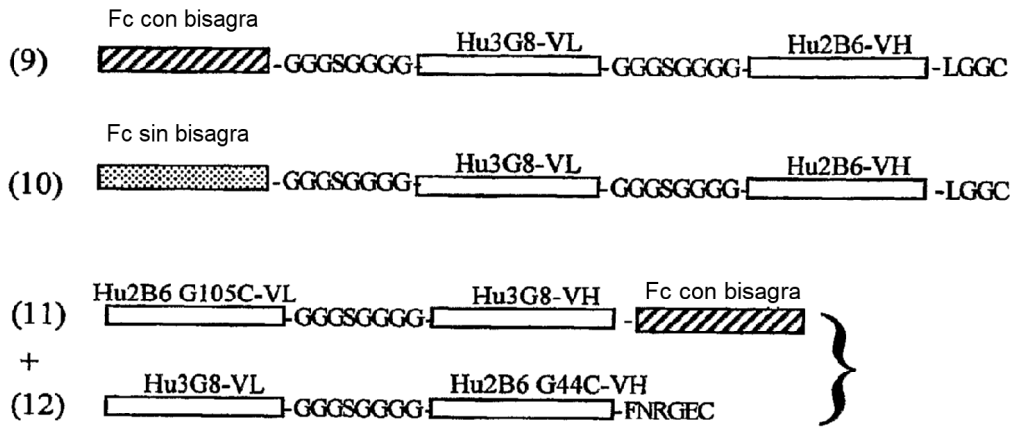
FIG. 11



**FIG. 12**

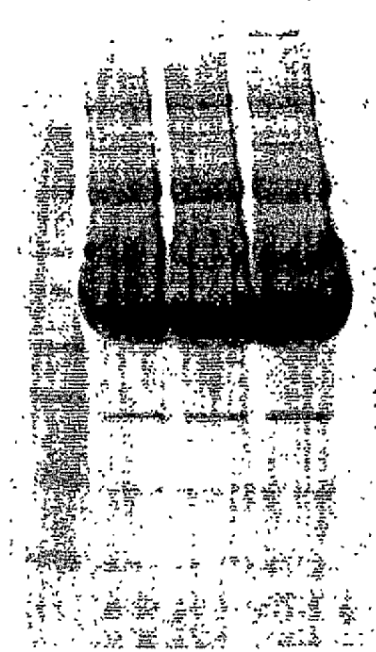


**FIG. 13**



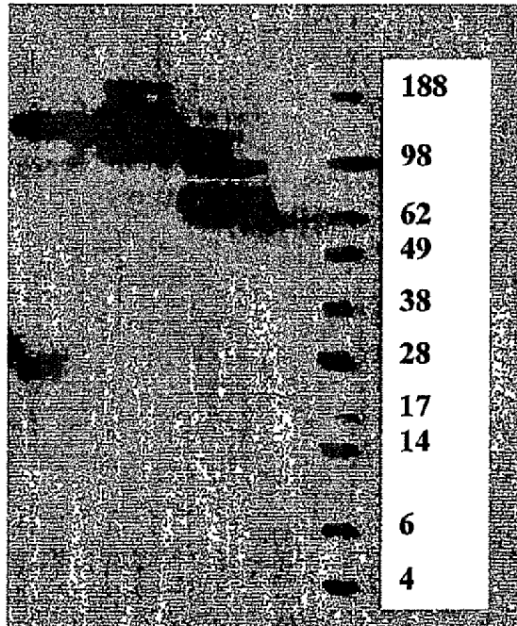
**FIG. 14**

M 1 2 3

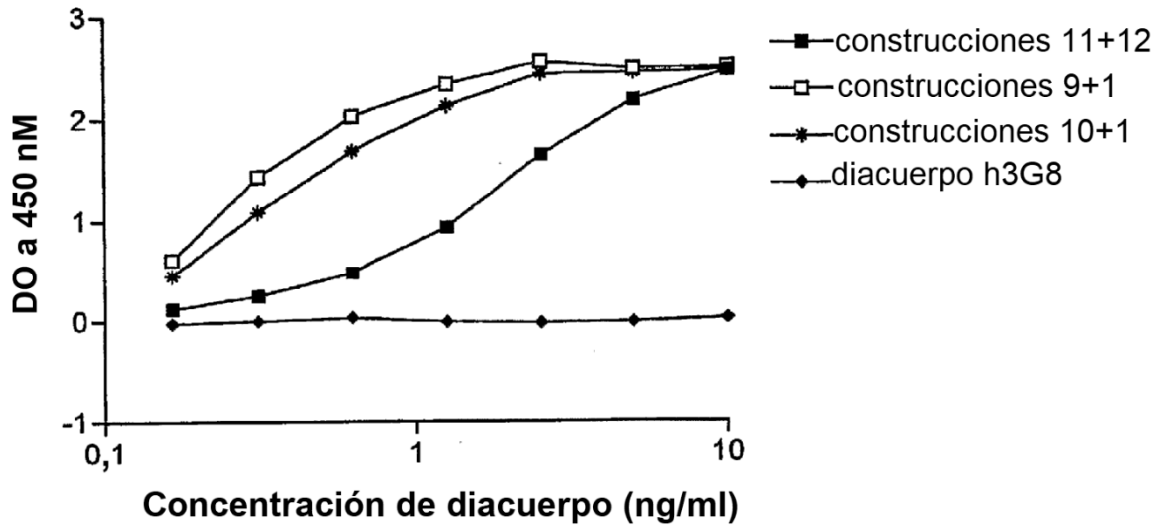


**FIG. 15A**

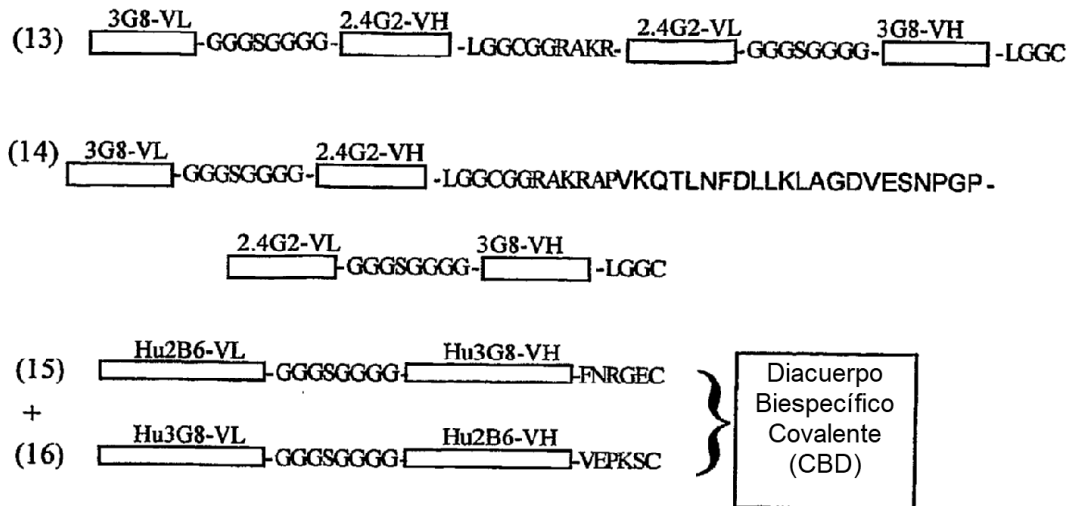
3 2 1 M



**FIG. 15B**

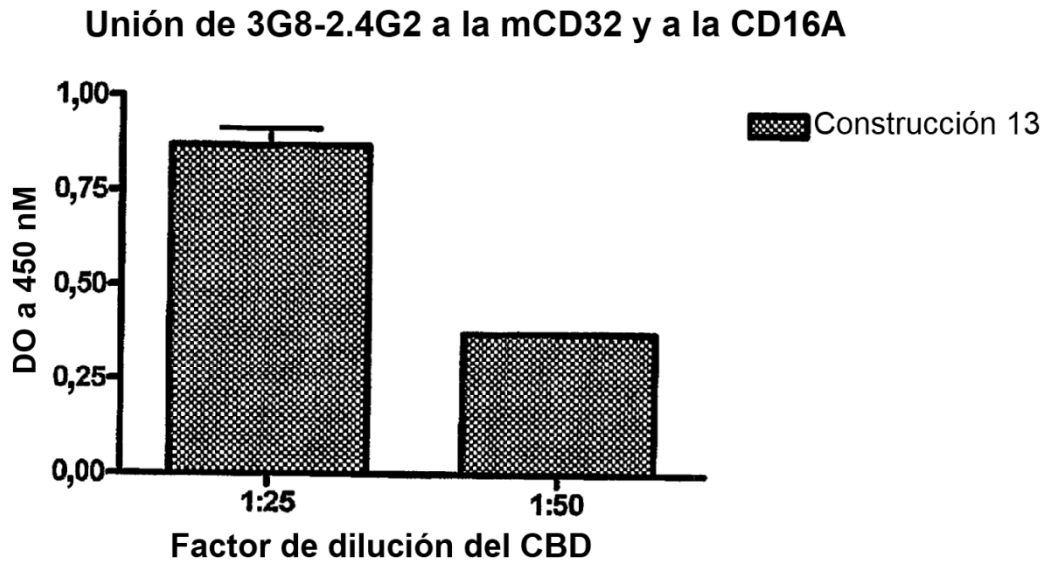


**FIG. 16**



**FIG. 17**





**FIG. 18**

Unión del CBD Hu2B6-Hu3G8 a la CD32B y a la CD16A

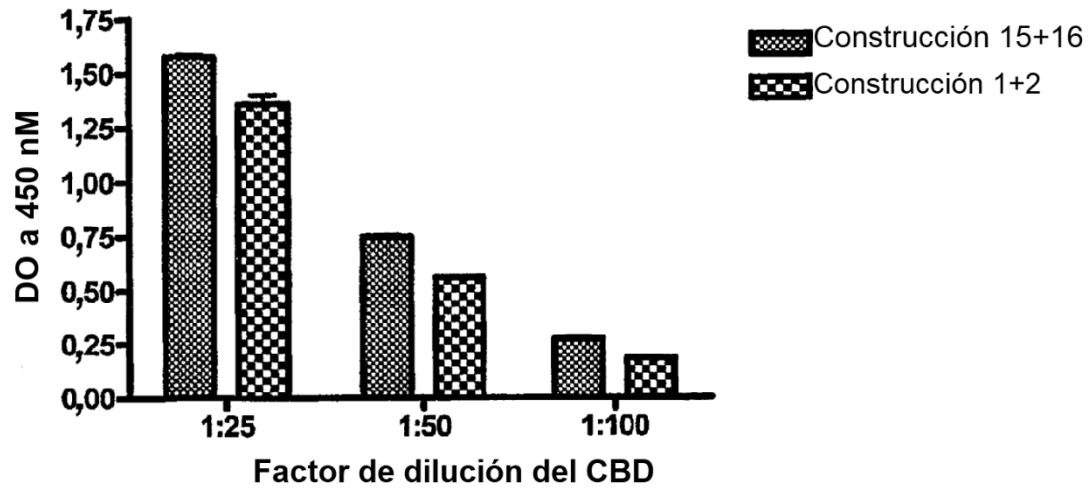


FIG. 19