

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 647**

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)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2006** **E 18191562 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023** **EP 3479844**

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:
06.06.2024

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:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 971 647 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

1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a moléculas de diacuerpos y sus usos en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos, incluidos trastornos inmunológicos y 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 a epítopos, que pueden reconocer epítopos iguales o diferentes. Además, los epítopos pueden ser de la misma o diferentes moléculas o estar ubicados en las mismas o diferentes células. Las cadenas polipeptídicas individuales de la molécula de diacuerpo pueden estar conectadas covalentemente a través de enlaces covalentes no peptídicos, tales como, pero sin limitarse a, enlaces disulfuro de restos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. En descripciones particulares, las moléculas de diacuerpo pueden comprender adicionalmente una región Fc, que permite modificar genéticamente una funcionalidad similar a un anticuerpo en la molécula.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El diseño de diacuerpos covalentes se basa en la construcción Fv de cadena sencilla (scFv) (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). En una IgG intacta y no modificada, los dominios VL y VH están ubicados en cadenas polipeptídicas separadas, es decir, la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de los dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión a epítopos del anticuerpo. Por el contrario, la construcción scFv comprende un dominio VL y VH de un anticuerpo contenido en una única cadena polipeptídica en donde los dominios están separados por un conector flexible de longitud suficiente para permitir el autoensamblaje de los dos dominios en un sitio de unión a epítopo funcional. Cuando el autoensamblaje es imposible debido a un conector de longitud insuficiente (menos de aproximadamente 12 restos de aminoácido), dos de las construcciones scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente, asociándose la VL de una cadena con la VH de la otra (revisado por Marvin et al., 2005, Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Por otra parte, se ha demostrado que la adición de un resto de cisteína al extremo C de la construcción permite la unión disulfuro de las cadenas polipeptídicas, estabilizando el dímero resultante sin interferir en las características de unión de la molécula bivalente (véase p. ej., Olafsen et al., 2004, Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Adicionalmente, cuando se seleccionan los dominios VL y VH de diferente especificidad, se puede construir no sólo una molécula bivalente, sino también biespecífica.

Los diacuerpos bivalentes tienen una amplia gama de aplicaciones que incluyen terapia e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y la modificación genética de diacuerpos en diversas aplicaciones, proporcionando una mayor avidéz por los antígenos multiméricos, el entrecruzamiento de diferentes antígenos y la orientación dirigida a tipos de células específicos dependiendo de la presencia de ambos antígenos diana. Debido a su mayor valencia, bajas tasas de disociación y rápida eliminación de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, de ~50 kDa o menos), las moléculas de diacuerpos conocidas en la técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la formación de imágenes de tumores. Fitzgerald et al., 1997, Protein Eng. 10:1221). De particular importancia es el entrecruzamiento de diferentes células, por ejemplo, el entrecruzamiento de células T citotóxicas con 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 epítopo del diacuerpo también pueden dirigirse a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria tal como CD3, CD16, CD32 o CD64, que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, también se descubrió que la unión del diacuerpo a los determinantes de las células efectoras, p. ej. receptores de Fcγ (FcγR) activan 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 las células efectoras se desencadena mediante la unión de un anticuerpo unido a un antígeno a una célula efectora mediante la interacción Fc-FcγR; por lo tanto, en este sentido, las moléculas de diacuerpos descritas en el presente documento pueden exhibir una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (p. ej., como se analiza en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento (p. ej., ensayo de ADCC)). Al entrecruzar las células tumorales y efectoras, el diacuerpo no solo acerca la célula efectora a la proximidad de las células tumorales, sino que también conduce a la destrucción efectiva del tumor (véase p. ej., Cao y Lam, 2003, Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197). El documento WO02/02781 describe diacuerpos biespecíficos que comprenden CL y CH1 que se asocian y mejoran la heterodimerización de los diacuerpos descritos.

2.1 RECEPTORES DE CÉLULAS EFECTORAS Y SU PAPEL EN EL SISTEMA INMUNITARIO

En la función inmunitaria tradicional, la interacción de complejos anticuerpo-antígeno con células del sistema inmunitario da como resultado una amplia gama de respuestas, que van de funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la desgranulación de mastocitos y la fagocitosis a señales inmunomoduladoras tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunológicos a receptores especializados de la superficie celular sobre células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunológicos resulta de la heterogeneidad estructural de los receptores

de Fc. Los receptores de Fc comparten dominios de unión a antígeno estructuralmente relacionados que presumiblemente median la señalización intracelular.

Los receptores de Fc γ , miembros de la superfamilia de proteínas del gen de las inmunoglobulinas, son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la porción Fc γ de las moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce inmunoglobulinas de uno o más isotipos mediante un dominio de reconocimiento en la cadena alfa del receptor de Fc γ . Los receptores de Fc γ se definen por su especificidad por los subtipos de inmunoglobulinas. Los receptores de Fc γ para IgG se denominan Fc γ R, para IgE como Fc ϵ R y para IgA Fc α R. Diferentes células accesorias portan receptores de Fc γ para anticuerpos de diferente isotipo, y el isotipo del anticuerpo determina qué células accesorias participarán en una respuesta determinada (revisado por Ravetch J.V. et al. 1991, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92; Gerber J.S. et al. 2001 Microbes e 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 de Fc γ , las células que los expresan y su especificidad de isotipo se resumen en la Tabla 1 (adaptada de Immunobiology: The immune system in health and disease, 4^a ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, Nueva York).

Receptores de Fc γ

Cada miembro de esta familia es una glicoproteína integrante de membrana, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con inmunoglobulinas, un dominio único que atraviesa la membrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Existen tres Fc γ R conocidos, denominados Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Los tres receptores están codificados por genes distintos; sin embargo, la amplia homología entre los tres miembros de la familia sugiere que surgieron de un progenitor común, tal vez por duplicación génica.

Fc γ RII(CD32)

Las proteínas Fc γ RII son glicoproteínas de membrana de 40 kDa que se unen sólo a la IgG complejada debido a una baja afinidad por la Ig monomérica (10^6 M⁻¹). Este receptor es el Fc γ R más expresado y está presente en todas las células hematopoyéticas, incluidos monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, mastocitos y plaquetas. Fc γ RII tiene sólo dos regiones similares a inmunoglobulinas en su cadena de unión a inmunoglobulina y, por lo tanto, una afinidad mucho menor por IgG que Fc γ RI. Existen tres genes de Fc γ RII humanos (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C), todos los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunológicos.

Las distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de Fc γ RII-A y Fc γ RII-B crean dos respuestas funcionalmente heterogéneas a la ligación del receptor. La diferencia fundamental es que la isoforma A inicia la señalización intracelular que conduce a la activación celular, tal como la fagocitosis y el estallido respiratorio, mientras que la isoforma B inicia señales inhibitorias, p. ej., la inhibición de la activación de las células B.

Fc γ RIII (CD16)

Debido a la heterogeneidad dentro de esta clase, el tamaño de Fc γ RIII oscila entre 40 y 80 kDa en ratón y hombre. Dos genes humanos codifican dos transcritos, Fc γ RIIIA, una glicoproteína integrante de membrana, y Fc γ RIIIB, una versión conectada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Un gen murino codifica un Fc γ RIII homólogo al Fc γ RIIIA humano que atraviesa la membrana. El Fc γ RIII comparte características estructurales con cada uno de los otros dos Fc γ R. Al igual que Fc γ RII, Fc γ RIII se une a IgG con baja afinidad y contiene los dos dominios extracelulares similares a Ig correspondientes. Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos, mastocitos y es el único Fc γ R en las células NK. Actualmente se sabe que Fc γ RIIIB conectado a GPI se expresa sólo en neutrófilos humanos.

Señalización a través de Fc γ R

Tanto las señales activadoras como las inhibitorias se transducen a través de los Fc γ R después de la ligación. Estas funciones diametralmente opuestas resultan de diferencias estructurales entre las diferentes isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmicos del receptor llamados motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) o motivos inhibitorios basados en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) explican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por Fc γ R. Los complejos Fc γ R que contienen ITAM incluyen Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen Fc γ RIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen Fc γ RIIA. El agrupamiento de Fc γ RIIA a través de complejos inmunológicos o entrecruzamiento de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas a receptores que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos aguas abajo (p. ej., Pl β K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen Fc γ RIIB se expresa en los linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico al Fc γ RIIA y se une a complejos de IgG de manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de Fc γ RIIB define esta subclase inhibitoria de Fc γ R. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se liga conjuntamente

- 5 con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la polifosfato 5'-fosfatasa inositol (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de la tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando en consecuencia la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Por lo tanto, el entrecruzamiento de FcγRIIB amortigua la respuesta de activación a la ligación de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. De este modo se interrumpe la activación de las células B, la proliferación de las células B y la secreción de anticuerpos.

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

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

3. COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico). El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de diacuerpo según la reivindicación 1 del presente documento. Se describen diacuerpos covalentes y/o moléculas de diacuerpos covalentes y su uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos que incluyen cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos alérgicos y enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos o virus. Preferiblemente, el diacuerpo de la presente descripción puede unirse a dos epítomos diferentes en dos células diferentes en donde el primer epítomo se expresa en un tipo de célula diferente al segundo epítomo, de manera que el diacuerpo puede unir las dos células.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítomo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítomo, y, opcionalmente, (iii) un tercer dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y, opcionalmente, (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítomo; en donde el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítomo.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítomo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítomo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el tercer y cuarto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítomo; en donde el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítomo.

También se describe una molécula de diacuerpo, cuya molécula comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1) específica para un primer epítomo, (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítomo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítomo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítomo; en donde el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítomo.

También se describe un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena

polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde 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 donde el segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo tetraespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo la primera molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyo primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en donde 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 que comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde 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 donde el segundo dominio y el cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL4)(VH4) que se une al cuarto epítipo.

En ciertas descripciones, el primer epítipo, el segundo epítipo y, cuando corresponda, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En otras descripciones, el primer epítipo, el segundo epítipo y, cuando corresponda, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser diferentes entre sí. En ciertas descripciones que comprenden un tercer dominio de unión a epítipo, el primer epítipo y el tercer epítipo pueden ser iguales. En ciertas descripciones que comprenden un cuarto dominio de unión a epítipo, el primer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En ciertas descripciones que comprenden un tercer dominio de unión a epítipo, el segundo epítipo y el tercer epítipo pueden ser iguales. En ciertas descripciones que comprenden un cuarto dominio de unión a epítipo, el segundo epítipo y el cuarto epítipo pueden ser iguales. En descripciones preferidas, el primer epítipo y el segundo epítipo son diferentes. En otras descripciones más que comprenden un tercer dominio de unión a epítipo y un cuarto dominio de unión a epítipo, el tercer epítipo y el cuarto epítipo pueden ser diferentes. Debe entenderse que en el presente documento se describe cualquier combinación de lo anterior.

En descripciones particulares, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. En otra descripción, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden derivar de la misma inmunoglobulina. En otra descripción más, el primer dominio y el quinto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. En otra

descripción más, el segundo dominio y el cuarto dominio del diacuerpo o molécula de diacuerpo pueden derivar de una inmunoglobulina diferente. Debe entenderse que en el presente documento se describe cualquier combinación de lo anterior.

En ciertas descripciones, la conexión covalente entre la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo o molécula de diacuerpo puede realizarse mediante un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos un resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. Los restos de cisteína en la primera o segunda cadenas polipeptídicas que son responsables de los enlaces disulfuro se pueden encontrar en cualquier lugar de la cadena polipeptídica, incluso dentro de los primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto dominios. En una descripción específica, el resto de cisteína de la primera cadena polipeptídica se encuentra en el primer dominio y el resto de cisteína de la segunda cadena polipeptídica se encuentra en el quinto dominio. El primer, segundo, cuarto y quinto dominios corresponden a las regiones variables responsables de la unión. En descripciones preferidas, los restos de cisteína responsables del enlace disulfuro entre la primera y segunda cadenas polipeptídicas están ubicados dentro del tercero y sexto dominios, respectivamente. En una descripción particular, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23), que puede ser codificada por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otra descripción, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica puede comprender los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23), que puede ser codificada por la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17). En otra descripción más, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:80). En otra descripción, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:79), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 80). En ciertas descripciones, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:79). En otras descripciones, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:79). En otras descripciones más, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio bisagra. En otras descripciones, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende el dominio bisagra. En otras descripciones más, el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende un dominio Fc, o una porción del mismo. En otras descripciones más, el sexto dominio de la segunda cadena polipeptídica comprende los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23); y el tercer dominio de la primera cadena polipeptídica comprende un dominio Fc, o una porción del mismo.

En otras descripciones, los restos de cisteína en el primer o segundo polipéptidos que son responsables del enlace disulfuro pueden ubicarse fuera del primer, segundo o tercer dominios en la primera cadena polipeptídica y fuera del cuarto, quinto y sexto dominios en la segunda. cadena polipeptídica. En particular, el resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al primer dominio o puede ser C-terminal con respecto al primer dominio. El resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal con respecto al segundo dominio. El resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal con respecto al tercer dominio. Adicionalmente, el resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal con respecto al cuarto dominio. El resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal con respecto al quinto dominio. Por consiguiente, el resto de cisteína en la segunda cadena polipeptídica puede ser C-terminal con respecto al sexto dominio o puede ser N-terminal con respecto al sexto dominio. En una descripción particular, el enlace disulfuro puede existir entre al menos dos restos de cisteína en la primera cadena polipeptídica y al menos dos restos de cisteína en la segunda cadena polipeptídica. En una descripción particular, en donde el tercer dominio y el sexto dominio no comprenden un dominio Fc, o una porción del mismo, el resto de cisteína puede estar en el extremo C de la primera cadena polipeptídica y en el extremo C de la segunda cadena polipeptídica. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está abarcada en la presente descripción.

En descripciones específicas como se describe más arriba, el diacuerpo covalente de la descripción abarca dímeros de moléculas de diacuerpo, en donde cada molécula de diacuerpo comprende una primera y una segunda cadenas polipeptídicas. En ciertas descripciones, las moléculas de diacuerpo pueden conectarse covalentemente para formar el dímero, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico. En descripciones preferidas, la conexión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las moléculas de diacuerpo del dímero. En descripciones aún más preferidas, la conexión covalente es un enlace disulfuro entre al menos un resto de cisteína en la primera cadena polipeptídica de cada una de las

moléculas de diacuerpo que forman el dímero, en donde dicho al menos un resto de cisteína está ubicado en el tercer dominio de cada primera cadena polipeptídica.

En ciertas descripciones, el primer dominio de la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal con respecto al segundo dominio. El primer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal con respecto al tercer dominio. El segundo dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al primer dominio o puede ser C-terminal con respecto al primer dominio. Adicionalmente, el segundo dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al tercer dominio o puede ser C-terminal con respecto al tercer dominio. Por consiguiente, el tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al primer dominio o puede ser C-terminal con respecto al primer dominio. El tercer dominio en la primera cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al segundo dominio o puede ser C-terminal con respecto al segundo dominio. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio puede ser N-terminal con respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal con respecto al quinto dominio. El cuarto dominio puede ser N-terminal con respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal con respecto al sexto dominio. El quinto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal con respecto al cuarto dominio. El quinto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al sexto dominio o puede ser C-terminal con respecto al sexto dominio. Por consiguiente, el sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al cuarto dominio o puede ser C-terminal con respecto al cuarto dominio. El sexto dominio en la segunda cadena polipeptídica puede ser N-terminal con respecto al quinto dominio o puede ser C-terminal con respecto al quinto dominio. Debe entenderse que cualquier combinación de lo anterior está abarcada en la presente descripción.

En ciertas descripciones, el primer dominio y el segundo dominio pueden ubicarse en el extremo C-terminal con respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica; o el primer dominio y el segundo dominio pueden ubicarse en el extremo N-terminal con respecto al tercer dominio en la primera cadena polipeptídica. Con respecto a la segunda cadena polipeptídica, el cuarto dominio y el quinto dominio pueden ubicarse en el extremo C-terminal con respecto al sexto dominio, o el cuarto dominio y el quinto dominio pueden ubicarse en el extremo N-terminal con respecto al sexto dominio. En ciertas descripciones se describe un diacuerpo biespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo cada molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en donde el tercer dominio está ubicado en el extremo N-terminal tanto con respecto al primer dominio como al segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica de cada molécula de diacuerpo están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde 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 donde el segundo dominio y el cuarto dominio de cada molécula de diacuerpo se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo.

También se describe un diacuerpo tetraespecífico covalente, cuyo diacuerpo es un dímero de moléculas de diacuerpo, comprendiendo la primera molécula de diacuerpo una primera y una segunda cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en donde el tercer dominio está ubicado en el extremo N-terminal tanto con respecto al primer dominio como al segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde el primer dominio y el quinto dominio se asocian para formar un primer sitio de unión (VL1)(VH1) que se une al primer epítipo; en donde 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 cadenas polipeptídicas, cuya primera cadena polipeptídica comprende (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una cuarta inmunoglobulina (VH4) específica para un cuarto epítipo y (iii) un tercer dominio que comprende un dominio Fc o porción del mismo, cuyos primer y segundo dominios están conectados covalentemente de manera que el primer y segundo dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo y en donde el tercer dominio está situado en el extremo N-terminal tanto con respecto al primer dominio como al segundo dominio; y cuya segunda cadena polipeptídica comprende (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la cuarta inmunoglobulina (VL4), (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la tercera inmunoglobulina (VH3), y (iii) un sexto dominio que comprende al menos un resto de cisteína, cuyos cuarto y quinto dominios están conectados covalentemente de manera que el cuarto y quinto dominios no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y en donde la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente, con la condición de que la conexión covalente no sea un enlace peptídico; en donde 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 donde 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 analizó anteriormente, los dominios de las cadenas polipeptídicas individuales están conectados covalentemente. En descripciones específicas, la conexión covalente entre el primer y segundo dominios, el primer y tercer dominios, el segundo y tercer dominios, el cuarto y quinto dominios, el cuarto y sexto dominios y/o el quinto y sexto dominios puede ser un enlace peptídico. En particular, el primer y segundo dominios, y el cuarto y quinto dominios pueden estar separados por el tercer dominio y el sexto dominio, respectivamente, o por restos de aminoácidos adicionales, siempre que el primero y segundo dominios, y el cuarto y quinto dominios no se asocien para formar un sitio de unión. El número de restos de aminoácidos puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos. En una descripción preferida, el número de restos de aminoácido entre los dominios es 8.

En ciertas descripciones, los dominios de la primera y segunda cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio Fc, es decir, opcionalmente, el tercer y sexto dominios, respectivamente, pueden comprender adicionalmente un dominio bisagra de manera que el dominio comprenda una región bisagra-Fc. En descripciones alternativas, la primera cadena polipeptídica o la segunda cadena polipeptídica pueden comprender un dominio bisagra sin comprender también un dominio Fc. Las cadenas pesadas, cadenas ligeras, regiones bisagra, dominios Fc y/o dominios bisagra-Fc pueden derivar de cualquier tipo de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En una descripción preferida, el tipo de inmunoglobulina es IgG, o cualquier subtipo de la misma, es decir, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. En otras descripciones, la inmunoglobulina de la que derivan las cadenas ligera y pesada está humanizada o quimerizada.

Adicionalmente, el primer epítipo y el segundo epítipo y, cuando corresponda, el tercer epítipo y el cuarto epítipo, a los que se une el diacuerpo o la molécula de diacuerpo pueden ser epítipos diferentes del mismo antígeno o pueden ser epítipos diferentes de antígenos diferentes. Los antígenos pueden ser cualquier molécula contra la cual se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas virales, fármacos, etc. En descripciones particulares, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como una célula B, una célula T, una célula fagocítica, una célula asesina natural (NK) o una célula dendrítica.

En ciertas descripciones, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc, cuyo receptor de Fc puede ser un receptor de Fc activador o un receptor de Fc inhibidor. En descripciones particulares, el receptor de Fc es un receptor de Fcγ, y el receptor de Fcγ es un receptor FcγRI, FcγRII o FcγRIII. En descripciones más preferidas, el receptor FcγRIII es el receptor FcγRIIIA (CD16A) o el receptor FcγRIIIB (CD16B) y, más preferiblemente, el receptor FcγRIII es el receptor FcγRIIIA (CD16A). En otra descripción preferida, el receptor FcγRII es el receptor FcγRIIA (CD32A) o el receptor FcγRIIB (CD32B), y más preferiblemente el receptor FcγRIIB (CD32B). En una descripción particularmente preferida, un sitio de unión del diacuerpo es específico para CD32B y el otro sitio de unión es específico para CD16A. En una descripción específica, al menos un sitio de unión a epítipo del diacuerpo o molécula de diacuerpo es específico para un receptor de Fc activador y al menos otro sitio es específico para un receptor de Fc inhibidor. En ciertas descripciones, el receptor de Fc activador es CD32A y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otras descripciones, el receptor de Fc activador es BCR y el receptor de Fc inhibidor es CD32B. En otras descripciones más, el receptor de Fc activador es IgE y el receptor de Fc inhibidor es CD32B.

En los casos en los que un sitio de unión a epítipo es específico para CD16A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 3G8, cuya secuencia se ha clonado y se establece en el presente documento. En otros casos en los que un sitio de unión a epítipo es específico para CD32A, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón IV.3. En otros casos más en los que un sitio de unión a epítipo es específico para CD32B, los dominios VL y VH pueden ser iguales o similares a los dominios VL y VH del anticuerpo de ratón 2B6, cuya secuencia se ha clonado y se establece en el presente documento. Debe entenderse que cualquiera de los dominios VL o VH de los anticuerpos 3G8, 2B6 y IV.3 se puede utilizar en cualquier combinación. La presente descripción también se dirige a un diacuerpo o molécula de diacuerpo bispecíficos en donde el primer epítipo es específico para CD32B y el segundo epítipo es específico para CD16A.

En otras descripciones, un sitio de unión a epítipo puede ser específico para un antígeno patológico. Como se emplea en el presente documento, un antígeno patológico es un antígeno implicado en una enfermedad patológica específica, que incluye cáncer, infección y enfermedad autoinmunitaria. Por tanto, el antígeno patológico puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno viral o un antígeno autoinmunitario. Los antígenos patológicos ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, lipopolisacáridos, antígenos virales seleccionados del grupo que consiste en antígenos virales del virus de la inmunodeficiencia humana, Adenovirus, Virus Respiratorio Sincitial, Virus del Nilo Occidental (p. ej., antígenos E16 y/o E53) y virus de la hepatitis. ácidos nucleicos (ADN y ARN) y colágeno. Preferiblemente, el antígeno patológico es un antígeno neutralizante. En una descripción preferida, cuando un sitio de unión a epítipo es específico para CD16A o CD32A, el otro sitio de unión a epítipo es específico para un antígeno patológico excluyendo antígenos autoinmunitarios. En otra descripción preferida más, cuando un sitio de unión a epítipo es específico para CD32B, el otro sitio de unión a epítipo es específico para cualquier antígeno patológico. En descripciones específicas, la molécula de diacuerpo se une a dos antígenos diferentes en la misma célula, por ejemplo, un sitio de unión al antígeno es específico para un receptor de Fc activador mientras que el otro es específico para un receptor de Fc inhibidor. En otras descripciones, la molécula de diacuerpo se une a dos epítopos neutralizantes virales distintos, por ejemplo, pero sin limitarse a, E16 y E53 del Virus del Nilo Occidental.

Los diacuerpos de la descripción se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. También se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo covalentes de la descripción, en los que al menos un sitio de unión es específico para un antígeno patológico, tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula cancerosa o en la superficie de una bacteria o virión y al menos otro sitio de unión es específico para un receptor de Fc, p. ej., CD16A.

También se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo de la descripción, en los que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para CD16A.

También se describe un método para inducir tolerancia inmunitaria a un antígeno patológico que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo covalente o molécula de diacuerpo covalente de la descripción, en los que al menos un sitio de unión es específico para CD32B y al menos otro sitio de unión es específico para dicho antígeno patológico. El antígeno patológico puede ser un alérgeno u otra molécula para la cual se desea tolerancia inmunitaria, tal como una proteína expresada en tejido trasplantado.

También se describe un método para la destoxificación que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un diacuerpo o molécula de diacuerpo covalentes de la descripción, en los que al menos un sitio de unión es específico para un marcador de superficie celular y al menos otro sitio de unión es específico para una toxina. En descripciones particulares, el diacuerpo administrado es uno en el que un sitio de unión es específico para un marcador de superficie celular tal como un Fc y el otro sitio de unión es específico para una toxina bacteriana o para un fármaco. En una descripción, el marcador de la superficie celular no se encuentra en los glóbulos rojos.

3.1 DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, se pretende que todos los términos técnicos, notaciones y otros términos o terminología científicos utilizados en el presente documento tengan los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una fácil referencia, y no se debe considerar necesariamente que la inclusión de tales definiciones en el presente documento represente una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, mecanismos convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales mecanismos se explican completamente en la bibliografía, tal como, Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1999, incluidos suplementos hasta 2001); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, incluidos suplementos hasta 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999; y Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000).

Como se emplean en el presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv biespecíficos conectados por enlaces disulfuro (sdFv), intraanticuerpos y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, p. ej., anticuerpos anti-Id y anti-anti-Id para anticuerpos de la descripción), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de

inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

Como se emplean en el presente documento, los términos "se une inmuno-específicamente", "reconoce inmuno-específicamente", "se une específicamente", "reconoce específicamente" y términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un antígeno (p. ej., epítipo o complejo inmunológico) 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 menor afinidad según lo determinado, p. ej., mediante inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea en el presente documento, complejo inmunológico se refiere a una estructura que se forma cuando al menos una molécula diana y al menos un polipéptido heterólogo que contiene una región Fc γ se unen entre sí formando un complejo de mayor peso molecular. Los ejemplos de complejos inmunológicos son los complejos antígeno-anticuerpo que pueden ser solubles o particulados (p. ej., un complejo antígeno/anticuerpo en la superficie celular).

Como se emplean en el presente documento, los términos "cadena pesada", "cadena ligera", "región variable", "región marco", "dominio constante" y similares, tienen su significado habitual en la técnica de la inmunología y se refieren a dominios de inmunoglobulinas de origen natural y los dominios correspondientes de proteínas de unión sintéticas (p. ej., recombinantes) (p. ej., anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, etc.). La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas naturales (p. ej., IgG) es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, normalmente expresadas como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La porción amino terminal ("N") de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi terminal ("C") de cada cadena define una región constante, teniendo las cadenas ligeras un único dominio constante y teniendo normalmente las cadenas pesadas tres dominios constantes y una región bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-V_L-C_L-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-V_H-CH₁-H-CH₂-CH₃-c (donde H es la región bisagra). Las regiones variables de una molécula de IgG consisten en regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que contienen los restos en contacto con el antígeno y segmentos no CDR, denominados segmentos marco, que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los bucles de las CDR (aunque ciertos restos marco también pueden entrar en contacto con el antígeno). Así, los dominios V_L y V_H tienen la estructura n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Cuando se hace referencia a proteínas de unión o anticuerpos (como se definen ampliamente en el presente documento), la asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md., 1987 y 1991). Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de resto a cada aminoácido. El esquema de numeración de Kabat es ampliable a anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias consenso en Kabat como referencia a aminoácidos conservados. Este método para asignar números de restos se ha convertido en norma en el campo e identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluidas variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un anticuerpo de ratón.

Como se emplea en el presente documento, el término "cadena pesada" se utiliza para definir la cadena pesada de un anticuerpo IgG. En una IgG nativa intacta, la cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina V_H, CH₁, bisagra, CH₂ y CH₃. A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, NH1, MD (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU IgG1 humano. Los ejemplos de las secuencias de aminoácidos que contienen los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de IgG1 se muestran en las FIGs. 1A y 1B como se describe, más abajo. Las FIGs. 1A y 1B también exponen secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de las cadenas pesadas de IgG2, IgG3 e IgG4. Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la región bisagra de IgG2 e IgG3, no todos los restos están numerados según el índice EU.

La "región bisagra" o "dominio bisagra" se definen generalmente como la extensión desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana. En la FIG. 1A se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de IgG1 humana (los restos de aminoácido en la FIG. 1A están numerados según el sistema Kabat). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último restos de cisteína que forman uniones S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones que se muestran en la FIG. 1A.

Como se emplean en el presente documento, los términos "región Fc", "dominio Fc" o términos análogos se utilizan para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. En la FIG. 1B se muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos que contiene la IgG1 humana. Aunque los límites pueden variar ligeramente, tal como se numeran según el sistema Kabat, el dominio Fc se extiende desde el aminoácido 231 al aminoácido 447 (los restos de aminoácido en la FIG. 1B están numerados según el sistema Kabat). La FIG. 1B también proporciona ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc de los isotipos de IgG IgG2, IgG3 e IgG4.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 231 al aminoácido 341 según el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 342 a 447 según el sistema de numeración de Kabat (FIG. 1B). El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana (también denominada dominio "Cy2") es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas conectadas a N entre los dos dominios CH2 de una IgG nativa intacta.

Como se emplean en el presente documento, los términos "proteína de unión a FcγR", "anticuerpo contra FcγR" y "anticuerpo anti-FcγR" se utilizan indistintamente y se refieren a una variedad de proteínas similares a inmunoglobulinas o derivadas de inmunoglobulinas. Las "proteínas de unión a FcγR" se unen a FcγR mediante una interacción con los dominios V_L y/o V_H (a diferencia de la unión mediada por Fcγ). Los ejemplos de proteínas de unión a FcγR incluyen anticuerpos totalmente humanos, policlonales, quiméricos y humanizados (p. ej., que comprenden 2 cadenas pesadas y 2 ligeras), fragmentos de los mismos (p. ej., fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), anticuerpos bifuncionales o multifuncionales (véanse, p. ej., Lanzavecchia et al., 1987, Eur. J. Immunol. 17:105), anticuerpos de cadena sencilla (véase, p. ej., Bird et al., 1988, Science 242:423-26), proteínas de fusión (p. ej., proteínas de fusión de presentación en fagos), "minianticuerpos" (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.837.821) y otras proteínas de unión a antígenos que comprenden un dominio V_L y/o V_H o fragmento del mismo. En una descripción, la proteína de unión a FcγRIIIA es un "anticuerpo tetramérico" es decir, que tiene generalmente la estructura de una IgG de origen natural y que comprende dominios variables y constantes, es decir, dos cadenas ligeras que comprenden un dominio V_L y un dominio constante de cadena ligera y dos cadenas pesadas que comprenden un dominio V_H y una bisagra de cadena pesada y dominios constantes.

Como se emplean en el presente documento, el término "antagonistas de FcγR" y términos análogos se refieren a proteínas y sustancias no proteicas, incluidas moléculas pequeñas que suscitan antagonismo de al menos una actividad biológica de un FcγR, p. ej., bloqueo de señalización. Por ejemplo, las moléculas de la descripción bloquean la señalización bloqueando la unión de IgG a un FcγR.

Como se emplea en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de polipéptidos o proteínas se refiere a un polipéptido o proteína que comprenden una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de restos de aminoácido. El término "derivado" como se emplea en el presente documento también se refiere a un polipéptido o proteína que han sido modificados, es decir, mediante anclaje covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido o proteína. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, se puede modificar un anticuerpo, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, conexión a un antígeno celular u otra proteína, etc. Se pueden producir un polipéptido o proteína derivados mediante modificaciones químicas utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, un polipéptido derivado o un derivado proteico poseen una función similar o idéntica a la del polipéptido o proteína de los cuales derivan.

Como se emplea en el presente documento, el término "derivado" en el contexto de un derivado no proteico se refiere a una segunda molécula orgánica o inorgánica que se forma basándose en la estructura de una primera molécula orgánica o inorgánica. Un derivado de una molécula orgánica incluye, pero sin limitarse a, una molécula modificada, p. ej., mediante la adición o deleción de un grupo hidroxilo, metilo, etilo, carboxilo o amina. Una molécula orgánica también puede estar esterificada, alquilada y/o fosforilada.

Como se emplea 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 de ellas al menos un dominio V_L y un dominio V_H o fragmento de los mismos, en donde ambos dominios están comprendidos dentro de una única cadena polipeptídica. En ciertas descripciones, "molécula de diacuerpo" incluye moléculas que comprenden un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. Dichas cadenas polipeptídicas en el complejo pueden ser iguales o diferentes, es decir, la molécula de diacuerpo puede ser un homomultímero o un heteromultímero. En descripciones específicas, "molécula de diacuerpo" incluye dímeros o tetrámeros o dichas cadenas polipeptídicas que contienen un dominio tanto V_L como V_H. Las cadenas polipeptídicas individuales que comprenden las proteínas multiméricas pueden conectarse covalentemente a al menos otro péptido del multímero mediante enlaces disulfuro intercatenarios.

Como se emplean en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se utilizan indistintamente para referirse a una afección en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se utiliza indistintamente con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u

órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se utiliza indistintamente con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, preferiblemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con inflamación. Por otra parte, la inflamación puede ser causada o no por un trastorno autoinmunitario. Por tanto, ciertos trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunitarios como inflamatorios.

"Cadenas polipeptídicas idénticas" como se emplea en el presente documento también se refiere a cadenas polipeptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos casi idéntica, por ejemplo, incluyendo cadenas que tienen una o más diferencias de aminoácidos, preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas, de manera que la actividad de las dos cadenas polipeptídicas no sea significativamente diferente

Como se emplea en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor resultante del crecimiento anormal e incontrolado de células. Como se emplea en el presente documento, el cáncer incluye explícitamente leucemias y linfomas. En algunas descripciones, cáncer se refiere a un tumor benigno que ha permanecido localizado. En otras descripciones, el cáncer se refiere a un tumor maligno que ha invadido y destruido estructuras corporales vecinas y se ha extendido a sitios distantes. En algunas descripciones, el cáncer está asociado con un antígeno canceroso específico.

Como se emplea en el presente documento, el término "agente inmunomodulador" y sus variaciones se refieren a un agente que modula el sistema inmunitario de un anfitrión. En ciertas descripciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor. En algunas otras descripciones, un agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitarse a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos y moléculas orgánicas.

Como se emplea en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a un fragmento de un polipéptido o proteína o una molécula no proteica que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es un fragmento de un polipéptido o proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es un fragmento de un polipéptido o proteína al que se une inmuno-específicamente un anticuerpo según se determina mediante cualquier método bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no tienen por qué ser necesariamente inmunogénicos.

Como se emplea en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un péptido o polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácido contiguos, al menos 10 restos de aminoácido contiguos, al menos 15 restos de aminoácido contiguos, al menos 20 restos de aminoácido contiguos, al menos 25 restos de aminoácido contiguos, al menos 40 restos de aminoácido contiguos, al menos 50 restos de aminoácido contiguos, al menos 60 restos de aminoácido contiguos, al menos 70 restos de aminoácido contiguos, al menos 80 restos de aminoácido contiguos, al menos 90 restos de aminoácido contiguos, al menos 100 restos de aminoácido contiguos, al menos 125 restos de aminoácido contiguos, al menos 150 restos de aminoácido contiguos, al menos 175 restos de aminoácido contiguos, al menos 200 restos de aminoácido contiguos, o al menos al menos 250 restos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una descripción específica, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido.

Como se emplean en el presente documento, los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (p. ej., ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Tales análogos se pueden generar utilizando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero sin limitarse a, inosina o bases tritiladas. Tales análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden cadenas principales modificadas que confieren atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a las nucleasas o una mayor capacidad para cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de hebra sencilla, doble hebra, pueden contener porciones tanto de hebra sencilla como de doble hebra, y pueden contener porciones de triple hebra, pero preferiblemente son ADN de doble hebra.

Como se emplea en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para tratar o controlar una enfermedad o trastorno. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la aparición de la enfermedad, p. ej., retrasar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad. Adicionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la descripción significa la cantidad de agente terapéutico solo, o combinado con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o control de una enfermedad.

Tal como se emplean en el presente documento, los términos "agente profiláctico" y "agentes profilácticos" se refieren a cualquier agente que pueda utilizarse en la prevención de un trastorno, o en la prevención de la recurrencia o propagación de un trastorno. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente profiláctico suficiente para prevenir la recurrencia o propagación de una enfermedad hiperproliferativa, particularmente cáncer, o la aparición de la misma en un paciente, incluidos, pero sin limitarse a, aquellos predispuestos a la enfermedad

hiperproliferativa, por ejemplo, aquellos genéticamente predispuestos al cáncer o expuestos previamente a carcinógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedades. Adicionalmente, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a un agente profiláctico de la descripción significa aquella cantidad de agente profiláctico solo, o combinado con otros agentes, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de enfermedades.

Como se emplean en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se emplea en el presente documento, el término "combinado con" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso del término "combinado con" no restringe el orden en el que se administran agentes profilácticos y/o terapéuticos a un sujeto con un trastorno. Se puede administrar un primer agente profiláctico o terapéutico antes de (p. ej., 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), concomitantemente o después de (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

"Función efectora", como se emplea en el presente documento, significa un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor de Fc o un antígeno. Las funciones efectoras incluyen, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las funciones efectoras incluyen tanto aquellas que interviene después de la unión de un antígeno como aquellas que intervienen independientemente de la unión del antígeno.

"Célula efectora", como se emplean en el presente documento, se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero sin limitarse a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y pueden ser de cualquier organismo, incluidos, pero sin limitarse a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

Como se emplean en el presente documento, el término "se une específicamente a un complejo inmunológico" y términos análogos se refieren a moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunológico y no se unen específicamente a otra molécula. Una molécula que se une específicamente a un complejo inmunológico puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según lo determinado por, p. ej., inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunológico no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un complejo inmunológico pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otros mecanismos conocidos por los expertos en la técnica.

Una "proteína de fusión estable" como se emplea en el presente documento se refiere a una proteína de fusión que sufre un nivel mínimo o nulo de degradación detectable durante la producción y/o almacenamiento según se evalúa utilizando ensayos bioquímicos y funcionales comunes conocidos por un experto en la técnica, y puede almacenarse durante un período prolongado de tiempo sin pérdida de actividad biológica, p. ej., unión a FcγR.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La Figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios bisagra (A) y Fc (B) de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas (dominio bisagra de IgG1 (SEQ ID NO:1); dominio bisagra de IgG2 (SEQ ID NO:2); dominio bisagra de IgG3 (SEQ ID NO:3); dominio bisagra de IgG4 (SEQ ID NO:4); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO:5); dominio Fc de IgG2 (SEQ ID NO:6); dominio Fc de IgG3 (SEQ ID NO:7); dominio Fc de IgG1 (SEQ ID NO:8)). Los restos de aminoácido mostrados en las FIGs. 1A y 1B están numerados según el sistema de numeración EU como en Kabat. Las secuencias de isotipo se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último restos de cisteína de las respectivas regiones bisagra, que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas, en las mismas posiciones. Para la figura 1B, los restos en el dominio CH2 se indican con +, mientras que los restos en el dominio CH3 se indican con ~.

FIG. 2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE CADENAS POLIPEPTÍDICAS DE ANTICUERPOS BIFUNCIONALES COVALENTES

Los polipéptidos de un diacuerpo bifuncional covalente consisten en un dominio VL de anticuerpo y un dominio VH de anticuerpo separados por un conector peptídico corto. El conector de 8 restos de aminoácido evita el autoensamblaje de una única cadena polipeptídica en construcciones de scFv y, en cambio, predominan las interacciones entre los dominios VL y VH de diferentes cadenas polipeptídicas. Se crearon 4 construcciones (cada construcción se describe

desde el extremo amino ("n"), lado izquierdo de la construcción, hasta el extremo carboxi ("c"), lado derecho de la figura): construcción (1) (SEQ ID NO: 9) comprendía, n-el dominio VL de Hu2B6-conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO:10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (2) (SEQ ID NO:11) comprendía n-el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO:10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; construcción (3) (SEQ ID NO:12) comprendía n-el dominio VL de Hu3G8 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO:10)) - el dominio VH de Hu3G8 - y una secuencia C-terminal (LGGC)-c; la construcción (4) (SEQ ID NO:13) comprendía n-el dominio VL de Hu2B6 - conector (GGGSGGGG (SEQ ID NO:10)) - el dominio VH de Hu2B6 - y una secuencia C-terminal (LGGC)-c.

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

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

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

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

FIG. 5 UNIÓN DE CBD DE h2B6-h3G8 A sCD32B Y sCD16A

La unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA tipo sándwich. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria era sCD16A conjugado con HRP. Como control se utilizó CMD h3G8, que se une a CD16A.

FIG. 6 A-C ANÁLISIS BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPOS A sCD16A, sCD32B y sCD32B

La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A, sCD32B y sCD32A (control negativo) se analizó mediante análisis SPR. También se probó scFv de h3G8 como control. (A) Unión a sCD16; (B) Unión a sCD32B y (C) Unión a sCD32A. Se inyectaron diacuerpos a una concentración 100 nM y scFv a una concentración 200 nM, sobre las superficies receptoras a un caudal de 50 ml/min durante 60 segundos.

FIG. 7 A-C ANÁLISIS BIACORE DE LA UNIÓN DE DIACUERPOS A sCD16A y sCD32B

La unión de CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 y CMD h3G8 a sCD16A y sCD32B se analizó mediante análisis SPR. También se probó scFv de h3G8 como control. (A) Unión de CMD h3G8 a sCD16A; (B) Unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD16A; (C) Unión de scFv de h3G8 a sCD16A; (D) Unión de CMD h2B6 a sCD32B; y (E) Unión de CBD h2B6-h3G8 a sCD32B. Se inyectaron diacuerpos a concentraciones 6,25-200 nM sobre las superficies receptoras a un caudal de 70 ml/min durante 180 segundos.

FIG. 8 ESQUEMA QUE REPRESENTA LA INTERACCIÓN DE CADENAS POLIPEPTÍDICAS QUE COMPRENDEN LOS DOMINIOS VL Y VH PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO BIESPECÍFICO COVALENTE

NH₂ y COOH representan el extremo amino terminal y el extremo carboxi terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa el resto de cisteína C-terminal en cada cadena polipeptídica. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas de puntos y discontinuas sirven para distinguir entre las dos cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las porciones conectoras de dichas cadenas. Fv de h2B6 y Fv de h3G8 indican un sitio de unión a epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

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

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

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

La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA tipo sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinantes: cotransfección de pMGX669 y pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX667 y pMGX676, que expresan las construcciones 2 y 5, respectivamente; y cotransfección de pMGX674 y pMGX676, que expresan las construcciones 5 y 6, respectivamente. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria era sCD16A conjugada con HRP.

FIG. 11 ESQUEMA QUE REPRESENTA LA INTERACCIÓN DE DOS CADENAS POLIPEPTÍDICAS, QUE COMPRENDEN CADA UNA UN DOMINIO Fc, PARA FORMAR UN DIACUERPO COVALENTE, BIVALENTE

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

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

La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA tipo sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron mediante 4 sistemas de expresión recombinantes: cotransfección de pMGX669 + pMGX674, que expresan las construcciones 1 y 6, respectivamente; cotransfección de pMGX669 + pMGX678, que expresan las construcciones 2 y 8, respectivamente; cotransfección de pMGX677 + pMGX674, que expresan las construcciones 7 y 6, respectivamente; y cotransfección de pMGX677 + pMGX678, que expresan las construcciones 7 y 8, respectivamente. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria era sCD16A conjugada con HRP.

FIG. 13 ESQUEMA QUE REPRESENTA LA INTERACCIÓN DE CADENAS POLIPEPTÍDICAS PARA FORMAR UNA MOLÉCULA DE DIACUERPO TETRAMÉRICO

NH₂ y COOH representan el extremo amino terminal y el extremo carboxi terminal, respectivamente, de cada cadena polipeptídica. S representa al menos un enlace disulfuro entre un resto de cisteína en la segunda secuencia conectora, la cadena polipeptídica "más pesada" que porta Fc y un resto de cisteína en la secuencia C-terminal de la cadena polipeptídica "más ligera" que no porta Fc. VL y VH indican el dominio ligero variable y el dominio pesado variable, respectivamente. Las líneas de puntos y discontinuas sirven para distinguir entre cadenas polipeptídicas y, en particular, representan las primeras porciones conectoras de dichas cadenas más pesadas o el conector de dichas cadenas más ligeras. CH2 y CH3 representan los dominios constantes CH2 y CH3 de un dominio Fc. Fv h2B6 y Fv h3G8 indican un sitio de unión a epítipo específico para CD32B y CD16, respectivamente.

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

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

FIG. 15 AB ANÁLISIS DE SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA WESTERN DE DIACUERPOS TETRAMÉRICOS DE AFINIDAD

Los diacuerpos producidos por sistemas de expresión recombinantes cotransfectados con vectores que expresan las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1 y las construcciones 11 y 12 se sometieron a análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y análisis de transferencia Western utilizando anti-H + L de IgG1 humana de cabra como sonda (B). Las proteínas en el gel SDS-PAGE se visualizaron con Simply Blue Safestain (Invitrogen). Para los paneles A y B, las moléculas de diacuerpo que comprenden las construcciones 10 y 1, las construcciones 9 y 1 y las construcciones 11 y 12A están en las calles 1, 2 y 3, respectivamente.

FIG.16 UNIÓN DE MOLÉCULAS DE DIACUERPO QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc Y ENLACES DISULFURO INTERCATENARIOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE A sCD32B Y sCD16A

La unión de moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc y enlaces disulfuro modificados genéticamente entre las cadenas polipeptídicas "más ligera" y "más pesada" a sCD32B y sCD16A se analizó en un ELISA tipo sándwich. Los diacuerpos analizados se produjeron mediante 3 sistemas de expresión recombinantes: que expresaban las construcciones 1 y 10, que expresaban las construcciones 1 y 9, y que expresaban las construcciones 11 y 12, respectivamente. Se utilizó sCD32B como proteína diana. La sonda secundaria era sCD16A conjugada con HRP. La unión de h3G8 se utilizó como control.

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

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

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

La unión de moléculas de diacuerpo derivadas de la construcción 13 (SEQ ID NO: 97) de molécula precursora de poliproteína a CD32B murino (mCD32B) y CD16A soluble (sCD16A) se analizó en un ELISA tipo sándwich. Se utilizó mCD32B como proteína diana. La sonda secundaria era sCD16A conjugado con biotina.

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

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

5. DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo comprende un dominio VL y un dominio VH, que están conectados covalentemente de manera que los dominios no pueden autoensamblarse. La interacción de dos de las cadenas polipeptídicas producirá dos pares VL-VH, formando dos sitios de unión a epítipos, es decir, una molécula bivalente. Ni el dominio VH ni el VL están restringidos a ninguna posición dentro de la cadena polipeptídica, es decir, restringidos al extremo amino (N) o carboxi (C), ni los dominios están restringidos en sus posiciones relativas entre sí, es decir, el dominio VL puede ser N-terminal con respecto al dominio VH y viceversa. La única restricción es que esté disponible una cadena polipeptídica complementaria para formar diacuerpos funcionales. 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_A-VH_A), cada polipéptido comprenderá un VH_A y un VL_A. La homodimerización de dos cadenas polipeptídicas del anticuerpo dará como resultado la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_A, lo que da 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, formación de un heterodímero. Por ejemplo, para un diacuerpo biespecífico, una cadena polipeptídica comprenderá un VL_A y un VL_B; la homodimerización de dicha cadena dará

como resultado la formación de dos sitios de unión VL_A-VH_B , ya sea sin unión o con unión impredecible. Por el contrario, cuando dos cadenas polipeptídicas diferentes son libres de interactuar, p. ej., en un sistema de expresión recombinante, comprendiendo una un VL_A y un VH_B y comprendiendo la otra un VL_B y un VH_A , se formarán dos sitios de unión diferentes: VL_A-VH_A y VL_B-VH_B . Para todos los pares de cadenas polipeptídicas de diacuerpos, la posibilidad de alineamiento erróneo o unión errónea de las dos cadenas es una posibilidad, es decir, interacción de dominios VL-VL o VH-VH; sin embargo, la purificación de diacuerpos funcionales se gestiona fácilmente basándose en la inmunoespecificidad del sitio de unión adecuadamente dimerizado utilizando cualquier método basado en afinidad conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento, p. ej., cromatografía de afinidad.

En otras descripciones, una o más de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprenden un dominio Fc. Los dominios Fc en las cadenas polipeptídicas de las moléculas de diacuerpo se dimerizan preferentemente, lo que da como resultado la formación de una molécula de diacuerpo que exhibe propiedades similares a las de las inmunoglobulinas, p. ej., interacciones Fc-Fc γ R. Los diacuerpos que comprenden Fc pueden ser dímeros, p. ej., compuestos por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende 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 de un anticuerpo bivalente no modificado (FIG. 11). Tales moléculas de diacuerpos exhibirán fenotipos alterados con relación a una inmunoglobulina de tipo salvaje, p. ej., semivida sérica, propiedades de unión alteradas etc. En otras descripciones, las moléculas de diacuerpos que comprenden dominios Fc pueden ser tetrámeros. Tales tetrámeros comprenden dos cadenas polipeptídicas "más pesadas", es decir, una cadena polipeptídica que comprende un dominio VL, un VH y un dominio Fc, y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras", es decir, 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 desparejados para formar una molécula similar a Ig. Tal 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 epítopos iguales o diferentes. Diferentes epítopos pueden ser del mismo antígeno o epítopos de diferentes antígenos. En una descripción, los epítopos proceden de células diferentes. En otra descripción, los epítopos son antígenos de la superficie celular de la misma célula o virus. Los sitios de unión de epítopos pueden reconocer cualquier antígeno contra el cual se pueda generar un anticuerpo. Por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, toxinas bacterianas, marcadores de superficie celular, marcadores autoinmunitarios, proteínas virales, fármacos, etc. En descripciones particulares, al menos un sitio de unión a epítopo del diacuerpo es específico para un antígeno en una célula particular, tal como una célula B o una célula T, una célula fagocítica, una célula asesina 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 descripciones, la secuencia conectora de aminoácidos es GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) codificada por la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 76).

En ciertas descripciones, cada cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo está modificada genéticamente para comprender al menos un resto de cisteína que interactuará con una contraparte de al menos un resto de cisteína en una segunda cadena polipeptídica de la descripción para formar un enlace disulfuro intercatenario. Dichos enlaces disulfuro intercatenarios sirven para estabilizar la molécula de diacuerpo, mejorando la expresión y recuperación en sistemas recombinantes, dando como resultado una formulación estable y uniforme, así como mejorando la estabilidad del producto aislado y/o purificado *en vivo*. Dicho al menos un resto de cisteína puede introducirse como un único aminoácido o como parte de una secuencia de aminoácidos más grande, p. ej. dominio bisagra, en cualquier porción de la cadena polipeptídica. En una descripción específica, dicho al menos un resto de cisteína está modificado genéticamente para que aparezca en el extremo C de la cadena polipeptídica. En algunas descripciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGC. En una descripción específica, el extremo C de la cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos LGGC. En otra descripción, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en el polipéptido dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio bisagra, p. ej. SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. En una descripción específica, el extremo C de una cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio bisagra de IgG, p. ej. SEQ ID NO:1. En otra descripción, el extremo C de una cadena polipeptídica de una molécula de diacuerpo de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:79), que puede ser codificada mediante una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:80). En otras descripciones, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En una descripción específica, el extremo C de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 78). En otras descripciones más, dicho al menos un resto de cisteína se introduce en la cadena polipeptídica dentro de la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:23), que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:77). En una descripción específica, el extremo C de una cadena polipeptídica que comprende el diacuerpo de la descripción comprende la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO:23), que puede ser codificada por la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:77).

En ciertas descripciones, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende la secuencia de aminoácidos LGGC y están conectadas covalentemente mediante un enlace disulfuro entre los restos de cisteína en dichas secuencias LGGC. En otra descripción específica, la molécula de diacuerpo comprende al menos dos cadenas polipeptídicas, una de las cuales comprende la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO:23) mientras que la otra comprende un dominio bisagra (que contiene al menos un resto de cisteína), en donde dichas al menos dos cadenas polipeptídicas están conectadas covalentemente mediante un enlace disulfuro entre el resto de cisteína en FNRGEC (SEQ ID NO:23) y un resto de cisteína en el dominio bisagra. En descripciones particulares, el resto de cisteína responsable del enlace disulfuro ubicado en el dominio bisagra es Cys-128 (numerado según EU como en Kabat; ubicado en el dominio bisagra de una cadena pesada de IgG intacta y no modificada) y el resto de cisteína homólogo en SEQ ID NO: 23 es Cys-214 (numerado según EU como en Kabat; ubicado en el extremo C de una cadena ligera de IgG intacta y no modificada) (Elkabetz et al., 2005, J. Biol. Chem. 280: 14402-14412). En otras descripciones más, el al menos un resto de cisteína está modificado genéticamente para que aparezca en el extremo N de la cadena de aminoácidos. En otras descripciones más, el al menos un resto de cisteína está modificado genéticamente para que aparezca en la porción conectora de la cadena polipeptídica de la molécula de diacuerpo. En descripciones adicionales, el dominio VH o VL está modificado genéticamente para comprender al menos una modificación de aminoácido con respecto al dominio VH o VL parental de manera que dicha modificación de aminoácido comprenda una sustitución de un aminoácido parental por cisteína.

La descripción abarca moléculas de diacuerpos que comprenden un dominio Fc o una porción del mismo (p. ej. un dominio CH2 o un dominio CH3). El dominio Fc o porción del mismo pueden derivar de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina incluyendo, pero sin limitarse a, IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En descripciones preferidas, el dominio Fc (o porción del mismo) deriva de IgG. En descripciones específicas, el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un alotipo de los mismos. En una descripción, la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc, cuyo dominio Fc comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 seleccionados independientemente entre cualquier isotipo de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc que comprende el dominio CH2 derivado de IgG y el dominio CH3 derivado de IgE, o el dominio CH2 derivado de IgG1 y el dominio CH3 derivado de IgG2, etc.). Dicho dominio Fc puede modificarse genéticamente a una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo de la descripción en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de dicha cadena polipeptídica (p. ej., el dominio Fc, o porción del mismo, puede ser c-terminal con respecto tanto a los dominios VL como VH del polipéptido de la cadena; puede ser n-terminal con respecto tanto a los dominios VL como VH; o puede ser N-terminal con respecto a un dominio y c-terminal con respecto a otro (es decir, entre dos dominios de la cadena polipeptídica)).

La presente descripción también abarca moléculas que comprenden un dominio bisagra. El dominio bisagra deriva de cualquier isotipo o alotipo de inmunoglobulina, incluidos IgA, IgD, IgG, IgE e IgM. En descripciones preferidas, el dominio bisagra deriva de IgG, en donde el isotipo de IgG es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un alotipo de los mismos. Dicho dominio bisagra se puede modificar genéticamente a una cadena polipeptídica que comprende la molécula de diacuerpo junto con un dominio Fc de manera que la molécula de diacuerpo comprenda un dominio bisagra-Fc. En ciertas descripciones, el dominio bisagra y Fc se seleccionan independientemente de cualquier isotipo de inmunoglobulina conocido en la técnica o ilustrado en el presente documento. En otras descripciones, el dominio bisagra y Fc están separados por al menos otro dominio de la cadena polipeptídica, p. ej., el dominio VL. El dominio bisagra, u opcionalmente el dominio bisagra-Fc, pueden modificarse genéticamente a un polipéptido de la descripción en cualquier posición con respecto a otros dominios o porciones de dicha cadena polipeptídica. En ciertas descripciones, una cadena polipeptídica de la descripción comprende un dominio bisagra, cuyo dominio bisagra está en el extremo C de la cadena polipeptídica, en donde dicha cadena polipeptídica no comprende un dominio Fc. En otras descripciones más, una cadena polipeptídica de la descripción comprende un dominio bisagra-Fc, cuyo dominio bisagra-Fc está en el extremo C de la cadena polipeptídica. En descripciones adicionales, una cadena polipeptídica de la descripción comprende un dominio bisagra-Fc, cuyo dominio bisagra-Fc está en el extremo N de la cadena polipeptídica.

Como se analizó anteriormente, la descripción abarca multímeros de cadenas polipeptídicas, cada una de cuyas cadenas polipeptídicas comprende un dominio VH y VL. En ciertas descripciones, las cadenas polipeptídicas de dichos multímeros comprenden adicionalmente un dominio Fc. La dimerización de los dominios Fc conduce a la formación de una molécula de diacuerpo que exhibe una funcionalidad similar a la de una inmunoglobulina, es decir, función mediada por Fc (p. ej., interacción Fc-FcγR, unión del complemento, etc.). En ciertas descripciones, 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 descripciones, los dominios VL y VH que comprenden cada cadena polipeptídica tienen especificidad diferente y el diacuerpo es bivalente y biespecífico.

En otras descripciones más, las moléculas de diacuerpo de la descripción abarcan tetrámeros de cadenas polipeptídicas, cada una de cuyas cadenas polipeptídicas comprenden un dominio VH y VL. En ciertas descripciones, dos cadenas polipeptídicas del tetrámero comprenden adicionalmente un dominio Fc. Por lo tanto, el tetrámero está compuesto por dos cadenas polipeptídicas "más pesadas", cada una de las cuales comprende un dominio VL, VH y Fc, y dos cadenas polipeptídicas "más ligeras", que comprenden un dominio VL y VH. La interacción de una cadena más pesada y más ligera en un monómero bivalente junto con la dimerización de dichos monómeros a través de los dominios Fc de las cadenas más pesadas conducirá a la formación de una molécula similar a una inmunoglobulina tetravalente (ilustrada en el Ejemplo 6.2 y el Ejemplo 6.3). En ciertas descripciones, los monómeros son los mismos y

la molécula de diacuerpo tetravalente es mono-específica o bio-específica. En otras descripciones los monómeros son diferentes y la molécula tetravalente es bio-específica o tetra-específica.

La formación de una molécula de diacuerpo tetra-específica como se describe más arriba requiere la interacción de cuatro cadenas polipeptídicas diferentes. Tales interacciones son difíciles de lograr con eficacia dentro de un sistema de producción recombinante de una sola célula, debido a las muchas variantes de posibles emparejamientos erróneos de cadenas. Una solución para aumentar la probabilidad de emparejamientos erróneos consiste en diseñar mutaciones del tipo "botones en ojales" en los pares de cadenas polipeptídicas deseados. Tales mutaciones favorecen la heterodimerización sobre la homodimerización. Por ejemplo, con respecto a las interacciones Fc-Fc, se puede introducir una sustitución de aminoácidos (preferiblemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma una "botón", p. ej., triptófano) en el dominio CH2 o CH3 de manera que la interferencia estérica impida la interacción con un dominio mutado similar y obligue al dominio mutado a emparejarse con un dominio en donde se ha diseñado una mutación complementaria o acomodativa, es decir, 'el ojal' (p. ej., una sustitución por glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprendan la molécula de diacuerpo y, adicionalmente, pueden diseñarse en cualquier porción de las cadenas de polipéptidos de dicho par. Los métodos de modificación genética de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la modificación genética de moléculas similares a inmunoglobulinas, y están abarcados en el presente documento (véanse, p. ej., 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 descripción también abarca moléculas de diacuerpo que comprenden dominios Fc variantes o bisagra-Fc variantes (o porción de los mismos), cuyo dominio Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido (p. ej. sustitución, inserción, delección) con respecto a un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc de tipo salvaje (o porción de los mismos) comparables. Las moléculas que comprenden dominios Fc o dominios bisagra-Fc variantes (o una porción de los mismos) comparables (p. ej., anticuerpos) normalmente tienen fenotipos alterados con respecto a las moléculas que comprenden dominios Fc o dominios bisagra-Fc de tipo salvaje o porciones de los mismos. El fenotipo variante puede expresarse como una semivida sérica alterada, una estabilidad alterada, una susceptibilidad alterada a las enzimas celulares o una función efectora alterada según se analiza en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como alteradoras de la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0037000 y 2005/0064514, y Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 11/271 140 (Publicación Núm. US 2006-0134709), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación Núm. US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Autores de la presente invención.

Los diacuerpos bio-específicos de la descripción pueden unirse simultáneamente a dos epítomos separados y distintos. En ciertas descripciones, los epítomos proceden del mismo antígeno. En otras descripciones, los epítomos son de antígenos diferentes. En descripciones preferidas, al menos un sitio de unión a epítomo es específico para un determinante expresado en una célula efectora inmunitaria (p. ej. CD3, CD16, CD32, CD64, etc.) que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (NK) u otras células mononucleares. En una descripción, 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 descripción pueden exhibir una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden adicionalmente un dominio Fc (p. ej., como se analiza en cualquier ensayo de función efectora conocido en la técnica o se ilustra en el presente documento (p. ej., ensayo de ADCC). En ciertas descripciones, el diacuerpo bio-específico de la descripción se une tanto a un antígeno canceroso en una célula tumoral como a un determinante de célula efectora mientras activa dicha célula. En descripciones alternativas, el diacuerpo o molécula de diacuerpo bio-específicos de la descripción pueden inhibir la activación de una diana, p. ej., célula efectora, uniéndose simultáneamente, y por tanto conectando, un receptor activador e inhibidor en la misma célula (p. ej., se unen tanto a CD32A como a CD32B, a BCR y CD32B, o a IgE1 y CD32B) como se describe más arriba (véase, Sección Antecedentes). En una descripción adicional, el diacuerpo bio-específico puede exhibir propiedades antivirales al unirse simultáneamente dos epítomos neutralizantes en un virus (p. ej., epítomos de RSV; epítomos de WNV tales como E16 y E53).

En ciertas descripciones, las moléculas de diacuerpos bio-específicos de la descripción ofrecen oportunidades únicas para dirigirse a tipos de células específicos. Por ejemplo, el diacuerpo o la molécula de diacuerpo bio-específicos se pueden modificar genéticamente para que comprendan una combinación de sitios de unión a epítomos que reconozca un conjunto de antígenos exclusivos de una célula o tipo de tejido diana. Adicionalmente, cuando uno o ambos antígenos individuales son bastante comunes por separado en otros tejidos y/o tipos de células, se pueden utilizar dominios de unión de baja afinidad para construir el diacuerpo o la molécula de diacuerpo. Tales dominios de unión de baja afinidad no podrán unirse al epítomo o antígeno individual con suficiente avidez para fines terapéuticos. Sin embargo, cuando ambos epítomos o antígenos están presentes en una única célula o tejido diana, la avidez del diacuerpo o molécula de diacuerpo por la célula o tejido, con respecto a una célula o tejido que expresa sólo uno de los antígenos, aumentará de manera que dichos epítomos o antígenos estén presentes en una única célula o tejido diana. Tal molécula bio-específica puede exhibir una unión mejorada a uno o ambos de sus antígenos diana en células que expresan ambos antígenos con respecto a un diacuerpo mono-específico o un anticuerpo con especificidad para solo uno de los antígenos.

Preferiblemente, las propiedades de unión de los diacuerpos de la descripción se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar la actividad de unión y/o una o más funciones celulares efectoras mediadoras de FcγR (mediadas por interacciones Fc-FcγR o por la unión inespecífica de una molécula de diacuerpo a un FcγR) (Véase la sección 5.4.2 y 5.4.3). Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas, p. ej., diacuerpos, de la descripción de un FcγR se pueden determinar utilizando ensayos *in vitro* (ensayos de base bioquímica o inmunológica) conocidos en la técnica para determinar las interacciones dominio de unión-antígeno o Fc-FcγR, es decir, unión específica de un antígeno a un dominio de unión o unión específica de una región Fc a un FcγR, respectivamente, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón de superficie, ensayos de inmunoprecipitación (Véase la sección 5.4.2). En las descripciones más preferidas, las moléculas de la descripción tienen propiedades de unión similares en modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en el presente documento) así como en ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente descripción no excluye moléculas de la descripción que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos *in vitro*, pero exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas descripciones, las moléculas de la descripción están modificadas genéticamente para comprender un patrón de glicosilación alterado o una glicofoma alterada con respecto a la porción comparable de la molécula molde. Las glicoformas modificadas genéticamente pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero sin limitarse a, mejorar la función efectora. Las glicoformas modificadas genéticamente se pueden generar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo utilizando cepas de expresión modificadas genéticamente o variantes, mediante expresión conjunta con una o más enzimas, por ejemplo, DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT111), expresando un diacuerpo de la descripción en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o modificando uno o varios carbohidratos después de que el diacuerpo se haya expresado y purificado. Los métodos para generar glicoformas modificadas genéticamente se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, los descritos por Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al., 2001 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) documentos US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, Nueva Jersey); tecnología de modificación genética de glicosilación GlicoMab™ (GLYCART Biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véanse, p. ej., LOS documentos WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

La descripción abarca adicionalmente la incorporación de aminoácidos no naturales para generar los diacuerpos de la descripción. Los expertos en la técnica conocen tales métodos, como los que utilizan la maquinaria biosintética natural para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas, véase, p. ej., Wang et al., 2002 Chem. Com. 1: 1-11; Wang et al., 2001, Science, 292: 498-500; van Hest et al., 2001. Chem. Com. 19: 1897-1904. Las estrategias alternativas se centran en las enzimas responsables de la biosíntesis del aminoacil-ARNt, véanse, p. ej., Tang et al., 2001, J. Am. Chem. 123(44): 11089-11090; Kiick et al., 2001, FEBS Lett. 505(3): 465.

En algunas descripciones, la descripción abarca métodos para modificar un dominio VL, VH o Fc de una molécula de la descripción añadiendo o eliminando un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar los carbohidratos de las proteínas son bien conocidos en la técnica y están abarcados por la descripción, véanse p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.218.149; EP 0 359 096 B1; la Publicación de Estados Unidos Núm. 2002/0028486; el documento WO 03/035835; la Publicación de Estados Unidos Núm. 2003/0115614; la Patente de Estados Unidos Núm. 6.218.149; la Patente de Estados Unidos Núm. 6.472.511.

5.1 DOMINIOS DE UNIÓN DE DIACUERPOS

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

La descripción contempla el uso de cualquier anticuerpo conocido en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias o enfermedades infecciosas como fuente de dominios de unión para los diacuerpos de la descripción. En la sección 5.7.1 se proporcionan ejemplos no limitantes de anticuerpos contra el cáncer conocidos, así como otros anticuerpos específicos para los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos del cáncer enumerados en la sección 5.6.1; en la sección 5.7.2 se proporcionan ejemplos no limitantes de anticuerpos conocidos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias, así como anticuerpos contra los antígenos diana enumerados y anticuerpos contra los antígenos enumerados en la sección 5.6.2; en otras descripciones se pueden utilizar anticuerpos contra epítomos asociados con enfermedades infecciosas enumerados en la Sección 5.6.3. En ciertas descripciones, los anticuerpos comprenden una región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos, que se han identificado mediante los métodos de la descripción por tener una función efectora conferida y/o mayor mejorada por FcγRIIB y una menor afinidad por FcγRIIIA con respecto a una molécula comparable que

comprende una región Fc de tipo salvaje. Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se utilizan para el tratamiento o la prevención de trastornos inflamatorios que pueden modificarse genéticamente según la descripción se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se utilizan para el tratamiento o la prevención del trastorno autoinmunitario se presenta en la Tabla 10.

Para algunos usos, incluyendo el uso de anticuerpos *in vivo* en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible utilizar diacuerpos con dominios variables derivados de anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados. Los dominios variables de anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluidos los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las Patentes de Estados Unidos Núm. 4,444,887 y 4,716,111; y las Publicaciones Internacionales Núm. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo, una variante o un fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco 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 la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

No es necesario que las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan precisamente a las secuencias parentales, p. ej., la CDR donadora o el marco consenso se pueden mutagenizar mediante sustitución, inserción o delección de al menos un resto de manera que el resto de la CDR o del marco en ese sitio no corresponda ni al consenso ni al anticuerpo donador. Sin embargo, tales mutaciones preferiblemente no son extensas. Normalmente, al menos 75% de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de la región marco (FR) parental y las secuencias de CDR, más a menudo 90%, y más preferiblemente más de 95%. Los anticuerpos humanizados se pueden producir utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, injerto de CDR (Patente Europea Núm. EP 239.400; Publicación internacional Núm. WO 91/09967; y Patentes de Estados Unidos Núm. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), remodelación o reconstrucción de la superficie (Patentes Europeas Núm. 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 USA* 91:969-973), barajado de cadenas (Patente de Estados Unidos Núm. 5.565.332), y técnicas divulgadas, p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.407.213, 5.766.886, 5.585.089, Publicación Internacional Núm. WO 93/17105, 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 (sup. 23): 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 restos del marco en las regiones marco se sustituirán por el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante el modelado de las interacciones de los restos de la CDR y el marco para identificar los restos del marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos del marco inusuales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., Queen et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.585.089; Publicaciones de los Estados Unidos Núm. 2004/0049014 y 2003/0229208; Patentes de Estados Unidos Núm. 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 una descripción muy preferida, el dominio de unión humanizado se une específicamente al mismo epítipo que el anticuerpo murino donador. Un experto en la técnica apreciará que la descripción abarca el injerto de CDR de anticuerpos en general. Por tanto, los anticuerpos donador y aceptor pueden derivar de animales de la misma especie e incluso de la misma clase o subclase de anticuerpos. Sin embargo, lo más habitual es que los anticuerpos donador y aceptor deriven de animales de diferentes especies. Típicamente, el anticuerpo donador es un anticuerpo no humano, tal como un MAb de roedor, y el anticuerpo aceptor es un anticuerpo humano.

En algunas descripciones, al menos una CDR del anticuerpo donador se injerta en el anticuerpo humano. En otras descripciones, al menos dos y preferiblemente las tres CDR de cada una de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera se injertan en el anticuerpo humano. Las CDR pueden comprender las CDR de Kabat, las CDR de bucle estructural o una combinación de las mismas. En algunas descripciones, se puede utilizar un anticuerpo FcγRIIB humanizado que comprende al menos una cadena pesada injertada con CDR y al menos una cadena ligera injertada con CDR.

Los diacuerpos utilizados en los métodos incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante el anclaje covalente de cualquier tipo de molécula al diacuerpo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de diacuerpos incluyen diacuerpos que han sido modificados, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, conexión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo

mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, 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 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 inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse, p. ej., Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; y Patentes de Estados Unidos Núm. 6.311.415, 5.807.715, 4.816.567, y 4.816.397.

A menudo, los restos del marco en las regiones marco se sustituirán por el resto correspondiente del anticuerpo donador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelado de las interacciones de los restos de la CDR y el marco para identificar los restos del marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos del marco inusuales en posiciones particulares. (Véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323)

Los anticuerpos monoclonales a partir de los cuales se pueden preparar dominios de unión de los anticuerpos de la descripción se pueden producir utilizando una amplia variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluido el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando mecanismos de hibridoma que incluyen aquellos conocidos en la técnica e ilustrados, por ejemplo, por Harlow et al., en *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pág. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" como se emplea en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluido cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, y no al método mediante el cual se produce.

Los métodos para producir y escrutar anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En un ejemplo no limitante, se pueden inmunizar ratones con un antígeno de interés o una célula que exprese tal antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, p. ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. A continuación, los esplenocitos se fusionan mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada. Los hibridomas se seleccionan y clonan mediante dilución limitante. A continuación, los clones de hibridoma se analizan mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse inoculando a ratones por vía intraperitoneal clones de hibridoma positivos. Los antígenos de interés incluyen, pero sin limitarse a, antígenos asociados con los cánceres proporcionados en la sección 5.8.1, antígenos asociados con las enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias proporcionadas en la sección 5.8.2, antígenos asociados con las enfermedades infecciosas proporcionadas en la sección 5.8.3, y las toxinas proporcionadas en la sección 5.8.4.

También se pueden generar anticuerpos utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En una descripción particular, tal fago se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno, tales como Fab y Fv o Fv estabilizado por enlace disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p. ej., humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, p. ej., utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o cuenta. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, incluidos fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan como una proteína fusionada de forma recombinante con la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que se pueden utilizar para producir inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, incluyen los divulgados por Brinkman et al., en *J. Immunol. Methods*, 182:41-50, 1995; Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:952-958, 1994; Persic et al., *Gene*, 187:9-18, 1997; Burton et al., *Advances in Immunology*, 57:191-280, 1994; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y Patentes de Estados Unidos Núm. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

La tecnología de presentación en fagos se puede utilizar para aumentar la afinidad de un anticuerpo por su antígeno. Esta técnica sería útil para obtener anticuerpos de alta afinidad. La tecnología, conocida como maduración de la afinidad, emplea mutagénesis o paseo de CDR y reelección utilizando el antígeno afín para identificar anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (Véase, p. ej., Glaser et al., 1992, *J. Immunology* 149:3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semialeatorio de mutaciones de aminoácidos. Se pueden construir bibliotecas que consistan en un conjunto de clones variantes, cada uno de los cuales difiere por la alteración de un único aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácido para cada resto de CDR. Los mutantes con mayor afinidad de unión por el antígeno se pueden escrutar poniendo en contacto los

mutantes inmovilizados con el antígeno marcado. Se puede utilizar cualquier método de escrutinio conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor avidez hacia el antígeno (p. ej., ELISA) (Véanse Wu et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:6037; Yelton et al., 1995, J. Immunology 155:1994). También es posible el paseo por 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 técnica con mutaciones (p. ej., una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidez y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB a los que se unen inmunoespecíficamente. Se pueden utilizar mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., inmunoensayos) para analizar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

Se pueden utilizar tales mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, p. ej., mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por 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 fragmento del mismo. En una descripción preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas realizadas en uno o más restos de aminoácido no esenciales pronosticados.

5.1.1 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN SITIOS DE UNIÓN A EPÍTOPO QUE SE UNEN INMUNOESPECÍFICAMENTE A FcγRIIB

En una descripción particular, al menos uno de los dominios de unión de los diacuerpos de la descripción suscita agonismo sobre al menos una actividad de FcγRIIB. En una descripción, dicha actividad es la inhibición de la señalización mediada por receptores de células B. En otra descripción, el dominio de unión inhibe la activación de células B, la proliferación de células B, la producción de anticuerpos, la entrada de calcio intracelular de células B, la progresión del ciclo celular o la actividad de una o más moléculas de señalización aguas abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra descripción más, el dominio de unión mejora la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una descripción adicional, el dominio de unión inhibe la actividad MAP quinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por el receptor de células B. En otra descripción, el dominio de unión suscita agonismo sobre la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una descripción particular, dicho dominio de unión inhibe la activación de mastocitos, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina inducidas por FcεRI. En otra descripción, los dominios de unión de la descripción estimulan la fosforilación de FcγRIIB, estimulan el reclutamiento de SHIP, estimulan la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, o inhiben la activación de miembros de la familia MAP quinasa (p. ej., Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra descripción más, los dominios de unión de la descripción mejoran la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra descripción, los dominios de unión de la descripción inhiben la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos.

En otra descripción, los dominios de unión suscitan antagonismo sobre al menos una actividad de FcγRIIB. En una descripción, dicha actividad es la activación de la señalización mediada por receptores de células B. En una descripción particular, los dominios de unión mejoran la actividad de las células B, la proliferación de las células B, la producción de anticuerpos, el influjo de calcio intracelular o la actividad de una o más moléculas de señalización aguas abajo en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otra descripción particular más, los dominios de unión disminuyen la fosforilación de FcγRIIB o el reclutamiento de SHIP. En una descripción adicional, los dominios de unión mejoran la actividad MAP quinasa o el reclutamiento de Akt en la vía de señalización mediada por receptores de células B. En otra descripción, los dominios de unión suscitan antagonismo sobre la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB. En una descripción particular, los dominios de unión mejoran la activación de mastocitos, la movilización de calcio, la desgranulación, la producción de citocinas o la liberación de serotonina inducidas por FcεRI. En otra descripción, los dominios de unión inhiben la fosforilación de FcγRIIB, inhiben el reclutamiento de SHIP, inhiben la fosforilación de SHIP y su asociación con Shc, mejoran la activación de los miembros de la familia MAP quinasa (p. ej., Erk1, Erk2, JNK, p38, etc.). En otra descripción más, los dominios de unión inhiben la fosforilación de tirosina de p62dok y su asociación con SHIP y rasGAP. En otra descripción, los dominios de unión potencian la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos o macrófagos. En otra descripción, los dominios de unión previenen la fagocitosis, el aclaramiento de partículas opsonizadas por parte de los macrófagos esplénicos.

En otras descripciones, al menos uno de los dominios de unión se puede utilizar para dirigir los diacuerpos de la descripción a células que expresan FcγRIIB.

En una descripción particular, uno de los dominios de unión deriva de un anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6 o 3H7, que tiene los números de acceso de la ATCC PTA-4591 y PTA-4592, respectivamente. Los hibridomas que producen los anticuerpos 2B6 y 3H7 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 13 de agosto de 2002 según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de los procedimientos de patentes, y se les asignaron los números de acceso PTA-4591 (para el hibridoma que produce 2B6) y PTA-4592

(para el hibridoma que produce 3H7), respectivamente. En una descripción preferida, los dominios de unión son humanos o han sido humanizados, preferiblemente derivan de una versión humanizada del anticuerpo producido por el clon 3H7 o 2B6.

La descripción también abarca diacuerpos con dominios de unión de otros anticuerpos, que se unen específicamente a FcγRIIB, preferiblemente FcγRIIB humano, más preferiblemente FcγRIIB humano nativo, que derivan de clones que incluyen, pero sin limitarse a, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 y 1F2 que tienen los números Acceso de la ATCC., PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 y PTA-5959, respectivamente. Los hibridomas que producen los clones identificados anteriormente se depositaron según las disposiciones del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) el 7 de mayo de 2004. En descripciones preferidas, los dominios de unión de los anticuerpos descritos anteriormente están humanizados.

En una descripción específica, los dominios de unión utilizados en los diacuerpos de la presente descripción son de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente las 6 CDR) del anticuerpo producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra descripción, 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, p. ej., en un ensayo ELISA u otro inmunoensayo competitivo apropiado, y también se une a FcγRIIB con una mayor afinidad que aquella con la que el dominio de unión se une a FcγRIIA.

La presente descripción también abarca diacuerpos con dominios de unión que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y/o cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La presente descripción abarca adicionalmente diacuerpos con dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que aquella con la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo se unen a FcγRIIA, y que comprenden una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, incluidas las búsquedas de proteínas BLAST.

La presente descripción también abarca el uso de diacuerpos que contienen dominios de unión que se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que aquella con la que el dominio de unión que se une a FcγRIIA, que están 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 condiciones estrictas. En una descripción preferida, el dominio de unión se une específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que a FcγRIIA, y comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable y/o cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal de ratón producido por el clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2 en condiciones estrictas. En otra descripción preferida, los dominios de unión se unen específicamente a FcγRIIB con mayor afinidad que a FcγRIIA, y comprenden una o más CDR codificadas por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de nucleótidos de una o más CDR del anticuerpo monoclonal de ratón producido por clon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. Las condiciones de hibridación estrictas incluyen, pero sin limitarse a, hibridación con ADN unido al filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65°C, condiciones muy estrictas tales como la hibridación con ADN unido al filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 60°C, o cualquier otra condición de hibridación estricta conocida por los expertos en la técnica (véanse, 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 a 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 descritos anteriormente con mutaciones (p. ej., una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco o CDR. Preferiblemente, las mutaciones en estos dominios de unión mantienen o mejoran la avidéz y/o afinidad de los dominios de unión por FcγRIIB a los que se unen inmuno-específicamente. Se pueden utilizar mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., inmunoensayos) para analizar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno particular.

Se pueden utilizar mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, o fragmento del mismo, incluyendo, p. ej., mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por 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

fragmento del mismo. En una descripción preferida, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas realizadas en uno o más restos de aminoácido no esenciales pronosticados.

En descripciones preferidas, los dominios de unión derivan de anticuerpos humanizados. Un anticuerpo específico de FcyRIIB humanizado puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana.

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

En una descripción preferida, las regiones CDR del dominio de unión a FcyRIIB humanizado derivan de un anticuerpo murino específico para FcyRIIB. En algunas descripciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento comprenden alteraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, delecciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos del anticuerpo aceptor, es decir, regiones marco de dominio variable de cadena pesada y/o ligera humana que son necesarias para conservar la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal donador. En algunas descripciones, las regiones marco de los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento no consisten necesariamente en la secuencia de aminoácidos precisa de la región marco de una región variable de anticuerpo humano natural, sino que contienen diversas alteraciones, que incluyen, pero sin limitarse a, delecciones inserciones, modificaciones de aminoácidos que alteran la propiedad del anticuerpo humanizado, por ejemplo, mejoran las propiedades de unión de una región del anticuerpo humanizado que es específica para la misma diana que el anticuerpo específico de FcyRIIB murino. En las descripciones más preferidas, se realiza un número mínimo de alteraciones en la región marco para evitar introducciones a gran escala de restos del marco no humanos y para garantizar una inmunogenicidad mínima del anticuerpo humanizado en seres humanos. El anticuerpo monoclonal donador es preferiblemente un anticuerpo monoclonal producido por los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

En una descripción específica, el dominio de unión abarca dominios variables de un anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcyRIIB con una afinidad mayor que aquella con la que dicho anticuerpo se une a FcyRIIA, en donde el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de región variable de cadena pesada que comprende restos del marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcyRIIB con una afinidad mayor que aquella con la que dicho anticuerpo se une a FcyRIIA, p. ej., anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2. En otra descripción específica, los diacuerpos de la descripción comprenden dominios variables de un anticuerpo injertado con CDR que se une específicamente a FcyRIIB con una mayor afinidad que aquella con la que dicho anticuerpo se une a FcyRIIA, en donde el anticuerpo injertado con CDR comprende un dominio de región variable de cadena ligera que comprende restos del marco del anticuerpo receptor y restos del anticuerpo monoclonal donador, que se une específicamente a FcyRIIB con una afinidad mayor que aquella con la que dicho anticuerpo se une a FcyRIIA, p. ej., anticuerpo monoclonal producido a partir de los clones 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 o 1F2.

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

En una descripción específica, el diacuerpo comprende dominios variables de un anticuerpo 2B6 humanizado, en donde 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 de VH de 2B6, que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:28. En una descripción, el VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40. En otra descripción, el dominio VH de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VH, SEQ ID NO:87, y puede codificarse mediante la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:88. En otra descripción 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 SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:38. En una descripción, VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:42, o SEQ ID NO:43. En una descripción específica, VL de 2B6 tiene la secuencia de aminoácidos de Hu2B6VL, SEQ ID NO:89, y puede codificarse mediante la secuencia de nucleótidos proporcionada en SEQ ID NO:90.

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

humanizado comprende adicionalmente regiones VL, que consisten en los segmentos FR de un segmento VL de línea germinal humana y las regiones CDR de 3H7VL, que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:44.

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

Los anticuerpos para obtener dominios de unión que se incluirán en los diacuerpos de la descripción se pueden caracterizar adicionalmente mediante mapeo de epítomos, de manera que se pueden seleccionar anticuerpos que tengan la mayor especificidad para FcγRIIB en comparación con FcγRIIA. Los métodos de mapeo de epítomos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. En ciertas descripciones, se pueden utilizar proteínas de fusión que comprenden una o más regiones de FcγRIIB para mapear el epítipo de un anticuerpo. En una descripción específica, la proteína de fusión contiene la secuencia de aminoácidos de una región de un FcγRIIB fusionada a la porción Fc de IgG2 humana. Cada proteína de fusión puede comprender adicionalmente sustituciones de aminoácidos y/o reemplazos de ciertas regiones del receptor por la región correspondiente de un receptor homólogo, p. ej., FcγRIIA, como se muestra en la Tabla 2 a continuación. pMGX125 y pMGX132 contienen el sitio de unión a IgG del receptor FcγRIIB, el primero con el extremo C de FcγRIIB y el último con el extremo C de FcγRIIA y pueden utilizarse para diferenciar la unión del extremo C. Los otros tienen sustituciones FcγRIIA en el sitio de unión a IgG y cualquiera de los extremos N de FcγIIA o FcγIIB. Estas moléculas pueden ayudar a determinar la parte de la molécula receptora donde se unen los anticuerpos.

Tabla 2. Lista de proteínas de fusión que se pueden utilizar para investigar el epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIB. Los restos 172 a 180 pertenecen al sitio de unión a IgG de FcγRIIA y B. Los aminoácidos específicos de la secuencia de FcγRIIA están en negra.

Plásmido	Receptor	Extremo N	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C
pMGX125	RIIb	I Ib	KKFSRSDPN	45	APS—SS (I Ib)
pMGX126	RIIa/b	I Ia	QKFSRLDPN	46	APS—SS (I Ib)
pMGX127		I Ia	QKFSRLDPT	47	APS—SS (I Ib)
pMGX128		I Ib	KKFSRLDPT	48	APS—SS (I Ib)
pMGX129		I Ia	QKFSHLDPT	49	APS—SS (I Ib)
pMGX130		I Ib	KKFSHLDPT	50	APS—SS (I Ib)
pMGX131		I Ia	QKFSRLDPN	51	VPSMGSSSS(I Ia)
pMGX132		I Ib	KKFSRSDPN	52	VPSMGSSSS(I Ia)

Plásmido	Receptor	Extremo N	172-180	SEQ ID NO:	Extremo C
pMGX133	RIIa-131R	Ila	QKFSRLDPT	53	VPSMGSSSS(Ila)
pMGX134	RIIa-131H	Ila	QKFSLDPT	54	VPSMGSSSS(Ila)
pMGX135		Ilb	KKFSRLDPT	55	VPSMGSSSS(Ila)
pMGX136		Ilb	KKFSLDPT	56	VPSMGSSSS(Ila)

Las proteínas de fusión se pueden utilizar en cualquier ensayo bioquímico para determinar la unión a un anticuerpo anti-FcγRIIB, p. ej., un ELISA. En otras descripciones, se puede realizar una confirmación adicional de la especificidad del epítipo utilizando péptidos con restos específicos reemplazados por aquellos de la secuencia de FcγRIIA.

- 5 Los anticuerpos se pueden caracterizar utilizando ensayos para identificar la función de los anticuerpos, particularmente la actividad para modular la señalización de FcγRIIB. Por ejemplo, los ensayos de caracterización pueden medir la fosforilación de restos de tirosina en el motivo ITIM de FcγRIIB o medir la inhibición de la movilización de calcio generada por el receptor de células B. Los ensayos de caracterización pueden ser ensayos basados en células o libres de células.
- 10 Está bien establecido en la técnica que en los mastocitos la coagregación de FcγRIIB con el receptor de IgE de alta afinidad, FcεRI, conduce a la inhibición de la desgranulación inducida por antígeno, la movilización de calcio y la producción de citocinas. Metcalfe D.D. et al. 1997, *Fisiol. Rev.* 77:1033; Long E.O. 1999 *Annu Rev. Immunol* 17: 875). Los detalles moleculares de esta vía de señalización se han dilucidado recientemente (Ott V.L., 2002, *J. Immunol.* 162(9):4430-9). Una vez coagregado con FcεRI, FcγRIIB se fosforila rápidamente en tirosina en su motivo ITIM y a
- 15 continuación, recluta Src Homology-2 que contiene inositol-5-fosfatasa (SHIP), una polifosfato 5-fosfatasa inositol que contiene un dominio SH2, que a su vez se fosforila y se asocia con Shc y p62^{dok} (p62^{dok} es el prototipo de una familia de moléculas adaptadoras, que incluye dominios de señalización 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; Yamanshi et al., 1997, *Cell*, 88:205).
- 20 Los anticuerpos anti-FcγRIIB para su uso en la descripción también pueden caracterizarse por su capacidad para modular una o más respuestas mediadas por IgE. Preferiblemente, se utilizarán líneas celulares que coexpresan el receptor de alta afinidad para IgE y el receptor de baja afinidad para FcγRIIB para caracterizar los anticuerpos anti-FcγRIIB en la modulación de las respuestas mediadas por IgE. En una descripción específica, se utilizarán células de una línea celular de leucemia basófila de rata (RBL-H23; Barsumian E.L. et al. 1981 *Eur. J. Immunol.* 11:317)
- 25 transfectadas con FcγRIIB humano de longitud completa. RBL-2H3 es una línea celular de rata bien caracterizada que se ha utilizado ampliamente para estudiar los mecanismos de señalización tras la activación celular mediada por IgE. Cuando se expresa en células RBL-2H3 y se coagrega con FcεRI, FcγRIIB inhibe la movilización de calcio, la desgranulación y la producción de citocinas inducidas por 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).
- 30 Los anticuerpos para su uso en la descripción también pueden caracterizarse por la inhibición de la activación de mastocitos inducida por 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 FcγRIIB se sensibilizan con IgE y se estimulan con fragmentos F(ab')₂ de anti-IgG de ratón de conejo, para agregar FcεRI solo, o con anti-IgG de ratón de conejo completa para agregar FcγRIIB y FcεRI. En este sistema, se puede analizar la modulación indirecta de las
- 35 moléculas de señalización aguas abajo tras la adición de anticuerpos a las células sensibilizadas y estimuladas. Por ejemplo, se pueden analizar la fosforilación de tirosina de FcγRIIB y el reclutamiento y fosforilación de SHIP, la activación de miembros de la familia MAP quinasa, incluidos, pero sin limitarse a, Erk1, Erk2, JNK o p38; y la fosforilación de tirosina de p62^{dok} y su asociación con SHIP y RasGAP.
- 40 Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la activación de mastocitos inducida por FcεRI mediante los anticuerpos puede comprender lo siguiente: transfectar células RBL-H23 con FcγRIIB humano; sensibilizar las células RBL-H23 con IgE; estimular las células RBL-H23 con F(ab')₂ de anti-IgG de ratón de conejo (para agregar FcεRI solo y provocar la señalización mediada por FcεRI, como control), o estimular células RBL-H23 con anti-IgG de ratón de conejo completa (para coagregar FcγRIIB y FcεRI, lo que da como resultado la inhibición de la señalización mediada por FcεRI). Las células que han sido estimuladas con anticuerpos anti-IgG de ratón de conejo completos se pueden
- 45 preincubar adicionalmente con los anticuerpos. La medición de la actividad dependiente de FcεRI de células que han sido preincubadas con los anticuerpos y células que no han sido preincubadas con los anticuerpos, y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcεRI en estas células, indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcεRI por los anticuerpos.

El ensayo ilustrativo descrito anteriormente se puede utilizar, por ejemplo, para identificar anticuerpos que bloquean la unión del ligando (IgG) al receptor FcγRIIB y suscitar antagonismo sobre la inhibición mediada por FcγRIIB de la señalización de FcεRI evitando la coagregación de FcγRIIB y FcεRI. Este ensayo también identifica anticuerpos que mejoran la coagregación de FcγRIIB y FcεRI y suscitan agonismo sobre la inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB al promover la coagregación de FcγRIIB y FcεRI.

En algunas descripciones, los diacuerpos anti-FcγRIIB, que comprenden los dominios de unión a epítomos de los anticuerpos anti-FcγRIIB identificados descritos en el presente documento o conocidos en la técnica, se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE verificando y/o midiendo la desgranulación de mastocitos o basófilos, preferiblemente en un ensayo basado en células. Preferiblemente, los mastocitos o basófilos para su uso en tales ensayos se han modificado genéticamente para que contengan FcγRIIB humano utilizando métodos recombinantes convencionales conocidos por un experto en la técnica. En una descripción específica, los anticuerpos anti-FcγRIIB se caracterizan por su capacidad para modular una respuesta mediada por IgE en un ensayo de liberación de β-hexosaminidasa (enzima contenida en los gránulos) basada en células. La liberación de β-hexosaminidasa de los mastocitos y basófilos es un evento primario en las afecciones alérgicas e inflamatorias agudas. Aketani et al., 2001 *Immunol. Lett.* 75: 185-9; Aketani et al., 2000 *Anal. Chem.* 72: 2653-8). La liberación de otros mediadores inflamatorios que incluyen, pero sin limitarse a, serotonina e histamina, se puede analizar para medir una respuesta mediada por IgE según los métodos del presente documento. Aunque no se pretende limitarse a un mecanismo de acción particular, la liberación de gránulos tales como los que contienen β-hexosaminidasa de mastocitos y basófilos es un proceso dependiente de la concentración de calcio intracelular que se inicia mediante el entrecruzamiento de FcγRI con antígeno multivalente.

La capacidad de estudiar mastocitos humanos se ha visto limitada por la ausencia de cultivos adecuados de mastocitos humanos a largo plazo. Recientemente, se establecieron dos nuevas líneas de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre, denominadas LAD 1 y LAD2, a partir de productos 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 FcεRI y varios marcadores de mastocitos humanos. Se pueden utilizar células LAD 1 y 2 para evaluar el efecto de los anticuerpos sobre las respuestas mediadas por IgE. En una descripción específica, se pueden utilizar ensayos de liberación de β-hexosaminidasa basados en células tales como los descritos anteriormente en células LAD para determinar cualquier modulación de la respuesta mediada por IgE por los anticuerpos anti-FcγRIIB. En un ensayo ilustrativo, los mastocitos humanos, p. ej., LAD 1, se ceban con IgE humana quimérica antinitrofenol (NP) y se exponen a BSA-NP, el antígeno polivalente, y la desgranulación celular se controla midiendo la β-hexosaminidasa liberada al sobrenadante (Kirshenbaum et al., 2003, *Leukemia research*, 27:677-682).

En algunas descripciones, si los mastocitos humanos tienen una baja expresión de FcγRIIB endógeno, como se determina utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica, p. ej., tinción FACS, puede ser difícil verificar y/o detectar diferencias en la activación de la vía inhibidora mediada por los diacuerpos anti-FcγRIIB de la descripción. También se describen métodos alternativos, mediante los cuales la expresión de FcγRIIB puede regularse por incremento utilizando citocinas y condiciones de crecimiento particulares. Se ha descrito que FcγRIIB está altamente regulado por incremento en líneas celulares de monocitos humanos, p. ej., 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 IL4. Se ha descrito que la diferenciación de células U937 con dibutiril AMP cíclico aumenta la expresión de FcγRII (Cameron et al., 2002 *Immunology Letters* 83, 171-179). Por lo tanto, la expresión endógena de FcγRIIB en mastocitos humanos para su uso en los métodos del presente documento puede regularse por incremento utilizando citocinas, p. ej., IL-4, IL-13, para mejorar la sensibilidad de detección.

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

Específicamente, la señalización mediada por BCR comprende al menos uno o más de los siguientes: modulación de moléculas de señalización aguas abajo (p. ej., estado de fosforilación de FcγRIIB, reclutamiento de SHIP, localización de Btk y/o PLCγ, actividad MAP quinasa, reclutamiento de Akt (señal antiapoptótica), movilización de calcio, progresión del ciclo celular y proliferación celular.

Aunque numerosas funciones efectoras de la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB están mediadas a través de SHIP, recientemente se ha demostrado que las células B activadas por lipopolisacáridos (LPS) de ratones deficientes en SHIP exhiben una inhibición significativa de la movilización de calcio mediada por FcγRIIB, producción de Ins(1,4,5)P₃ y fosforilación de Erk y Akt (Brauweiler A. et al., 2001, *Journal of Immunology*, 167(1): 204-211). Por consiguiente, se pueden utilizar células B ex vivo de ratones deficientes en SHIP para caracterizar los anticuerpos. Un ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcγRIIB por parte de los anticuerpos puede comprender lo siguiente: aislar células B esplénicas de ratones deficientes en SHIP, activar dichas células con lipopolisacárido y estimular dichas células con F(ab')₂ anti-IgM para agregar BCR o con anti-IgM para coagregar BCR con FcγRIIB. Las células que han sido estimuladas con anti-IgM intacta para coagregar BCR con FcγRIIB pueden preincubarse adicionalmente con los anticuerpos. La actividad de las células dependiente de

FcyRIIB se puede medir mediante mecanismos convencionales conocidos en la técnica. La comparación del nivel de actividad dependiente de FcyRIIB en células que han sido preincubadas con los anticuerpos y células que no han sido preincubadas, y la comparación de los niveles indicaría una modulación de la actividad dependiente de FcyRIIB por parte de los anticuerpos.

- 5 La medición de la actividad dependiente de FcyRIIB puede incluir, por ejemplo, la medición de la movilización de calcio intracelular mediante citometría de flujo, la medición de la fosforilación de Akt y/o Erk, la medición de la acumulación de $PI(3,4,5)P_3$ mediada por BCR, o la medición de la proliferación de células B mediada por FcyRIIB.

- 10 Los ensayos se pueden utilizar, por ejemplo, para identificar diacuerpos o anticuerpos anti-FcyRIIB para su uso en la descripción que modulan la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcyRIIB bloqueando el sitio de unión del ligando (IgG) al receptor FcyRIIB y suscitando antagonismo sobre la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcyRIIB al prevenir la coagregación de FcyRIIB y BCR. Los ensayos también se pueden utilizar para identificar anticuerpos que mejoran la coagregación de FcyRIIB y BCR y suscitan agonismo sobre la inhibición de la señalización de BCR mediada por FcyRIIB.

- 15 Los anticuerpos anti-FcyRIIB también se pueden analizar para determinar la señalización mediada por FcyRII en monocitos/macrófagos humanos. La coagregación de FcyRIIB con un receptor que porta el motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) actúa para regular por disminución la fagocitosis mediada por FcyR utilizando SHIP como su efector. Tridandapani et al. 2002, J. Biol. Chem. 277(7):5082-9). La coagregación de FcyRIIA con FcyRIIB da como resultado una rápida fosforilación del resto de tirosina en el motivo ITIM de FcyRIIB, lo que lleva a una mejora en la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa. Adicionalmente, la coagregación de FcyRIIA con FcyRIIB da como resultado una regulación por disminución de la fosforilación de Akt, que es una serina-treonina quinasa que participa en la regulación celular y sirve para suprimir la apoptosis.

- 25 Los diacuerpos anti-FcyRIIB también pueden analizarse para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcyR en monocitos/macrófagos humanos. Por ejemplo, las células de una línea celular monocítica humana, THP-1, pueden estimularse con fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 contra FcyRII y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcyRIIA solo), o con anticuerpo monoclonal de ratón IV.3 completo y anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcyRIIA y FcyRIIB). En este sistema, se puede analizar la modulación de moléculas de señalización aguas abajo, tal como la fosforilación de tirosina de FcyRIIB, la fosforilación de SHIP, la asociación de SHIP con Shc, la fosforilación de Akt y la fosforilación de proteínas que tienen un peso molecular de 120 y 60-65 kDa tras la adición de moléculas de la descripción a las células estimuladas. Además, la eficacia fagocítica dependiente de FcyRIIB de la línea celular de monocitos se puede medir directamente en presencia y ausencia de anticuerpos.

- 35 Otro ensayo ilustrativo para determinar la inhibición de la fagocitosis mediada por FcyR en monocitos/macrófagos humanos mediante los anticuerpos puede comprender lo siguiente: estimulación de células THP-1 con Fab de anticuerpo anti-FcyRII de ratón IV.3 y anticuerpo anti-ratón de cabra (para agregar FcyRIIA solo y provocar la señalización mediada por FcyRIIA); o con anticuerpo anti-FcyRII de ratón y anticuerpo anti-ratón de cabra (para coagregar FcyRIIA y FcyRIIB e inhibir la señalización mediada por FcyRIIA. Las células que han sido estimuladas con anticuerpo anti-FcyRII de ratón y anticuerpo anti-ratón de cabra se pueden preincubar adicionalmente con las moléculas de la descripción. La medición de la actividad dependiente de FcyRIIA de células estimuladas que han sido preincubadas con moléculas de la descripción y células que no han sido preincubadas con los anticuerpos de la descripción y la comparación de los niveles de actividad dependiente de FcyRIIA en estas células indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcyRIIA por parte de los anticuerpos.

- 45 El ensayo ilustrativo descrito se puede utilizar, por ejemplo, para identificar dominios de unión que bloquean la unión del ligando del receptor FcyRIIB y suscitar antagonismo sobre la inhibición mediada por FcyRIIB de la señalización de FcyRIIA evitando la coagregación de FcyRIIB y FcyRIIA. Este ensayo también identifica dominios de unión que mejoran la coagregación de FcyRIIB y FcyRIIA y suscitan agonismo sobre la inhibición de la señalización de FcyRIIA mediada por FcyRIIB.

- 50 Los dominios de unión de FcyRIIB de interés se pueden analizar mientras están compuestos por anticuerpos midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja opsonizados con IgG marcada con fluoresceína (SRBC) mediante métodos descritos previamente (Tridandapani et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 20480-7). Por ejemplo, un ensayo ilustrativo para medir la fagocitosis comprende: tratar células THP-1 con los anticuerpos del presente documento o con un anticuerpo de control que no se une a FcyRII, comparar los niveles de actividad de dichas células, en donde se detecta una diferencia en las actividades de las células (p. ej., la actividad de formación de rosetas (el número de células THP-1 que se unen a SRBC recubiertos con IgG), la actividad de adherencia (el número total de SRBC unidos a células THP-1) y la tasa de fagocitosis) indicarían una modulación de la actividad dependiente de FcyRIIA por parte de los anticuerpos. Este ensayo se puede utilizar para identificar, por ejemplo, anticuerpos que bloquean la unión al ligando del receptor FcyRIIB y suscitan antagonismo sobre la inhibición de la fagocitosis mediada por FcyRIIB. Este ensayo también puede identificar anticuerpos que mejoran la inhibición de la señalización de FcyRIIA mediada por FcyRIIB.

En una descripción preferida, los dominios de unión modulan la actividad dependiente de FcγRIIB en monocitos/macrófagos humanos en al menos una o más de las siguientes maneras: modulación de moléculas de señalización aguas abajo (p. ej., modulación del estado de fosforilación de FcγRIIB, modulación de la fosforilación de SHIP, modulación de la asociación SHIP y Shc, modulación de la fosforilación de Akt, modulación de la fosforilación de proteínas adicionales en torno a 120 y 60-65 kDa) y modulación de la fagocitosis.

5.1.2 DOMINIOS DE UNIÓN A CD16A

La siguiente sección analiza las proteínas de unión a CD16A que pueden utilizarse como fuentes de regiones variables de cadena ligera y pesada para la producción de díacuerpos covalentes. Las proteínas de unión a CD16A incluyen moléculas que comprenden dominios VL y VH de anticuerpos anti-CD16A, cuyos dominios VH y VL se utilizan en la producción de los díacuerpos de la presente descripción.

Se pueden utilizar diversas proteínas de unión a CD16A con respecto a la presente descripción. Las proteínas de unión a CD16A adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, así como fragmentos de anticuerpos de unión a CD16A (p. ej., scFv o anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, minianticuerpos) y otras proteínas similares a anticuerpos que se unen a CD16A mediante una interacción con un dominio de región variable de cadena ligera, un dominio de región variable de cadena pesada, o ambos.

En algunas descripciones, la proteína de unión a CD16A comprende un dominio VL y/o VH que tiene una o más CDR con secuencias derivadas de un anticuerpo anti-CD16A no humano, tal como un anticuerpo anti-CD16A de ratón, y una o más regiones marco que derivan de secuencias del marco de una o más inmunoglobulinas humanas. Se conocen varios anticuerpos monoclonales anti-CD16A no humanos, a partir de los cuales se pueden obtener CDR y otras secuencias (véanse, 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; LEUKOCYTE 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 y Francis. Adicionalmente, como se muestra en los Ejemplos, se pueden obtener nuevas proteínas de unión a CD16A que reconocen CD16A humano expresado en células utilizando métodos bien conocidos para la producción y selección de anticuerpos monoclonales o proteínas de unión relacionadas (p. ej., tecnología de hibridoma, presentación en fagos y similares). Véanse, por ejemplo, O'Connel 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 citadas en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales de una especie no humana pueden quimerizarse o humanizarse utilizando mecanismos de humanización de anticuerpos conocidos en la técnica.

Alternativamente, se pueden producir anticuerpos completamente humanos contra CD16A utilizando animales transgénicos que tienen elementos de un sistema inmunitario humano (véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.569.825 y 5.545.806), utilizando células de sangre periférica humana (Casali et al., 1986, Science 234:476), escrutando una biblioteca de ADN de células B humanas según el protocolo general descrito por Huse et al., 1989, Science 246: 1275 y mediante otros métodos.

En una descripción preferida, el donador de unión proviene del anticuerpo 3G8 o una versión humanizada del mismo, p. ej., tales como los divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2004/0010124. Se contempla que, para algunos fines, puede ser ventajoso utilizar proteínas de unión a CD16A que se unan al receptor de CD16A en el mismo epítipo unido por 3G8, o al menos lo suficientemente cerca de este epítipo para bloquear la unión por 3G8. Los expertos en la técnica de la inmunología experimental conocen bien los métodos para el mapeo de epítopos y los experimentos de unión competitiva para identificar proteínas de unión con las propiedades de unión deseadas. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, citado más arriba; 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 al mismo sitio utilizando uno de los anticuerpos para capturar el antígeno sobre una placa de ELISA y midiendo a continuación la capacidad del segundo anticuerpo para unirse al antígeno capturado. La comparación de epítopos también se puede lograr marcando un primer anticuerpo, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo, y midiendo la capacidad de un segundo anticuerpo no marcado para inhibir la unión del primer anticuerpo al antígeno en las células, en solución, o en una fase sólida.

También es posible medir la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor de CD16A a los complejos inmunológicos formados sobre placas de ELISA. Tales complejos inmunológicos se forman recubriendo primero la placa con un antígeno tal como fluoresceína y aplicando a continuación un anticuerpo anti-fluoresceína específico a la placa. Este complejo inmunológico sirve después como ligando para receptores de Fc solubles tales como sFcRIIIa. Alternativamente, se puede formar y marcar un complejo inmunológico soluble, directa o indirectamente, con una enzima, radionúclido o fluoróforo. Después, se puede medir la capacidad de los anticuerpos para inhibir la unión de estos complejos inmunológicos marcados a los receptores de Fc en las células, en solución o en una fase sólida.

Las proteínas de unión a CD16A pueden comprender o no una región Fc de inmunoglobulina humana. Las regiones Fc no están presentes, por ejemplo, en las proteínas de unión a scFv. Las regiones Fc están presentes, por ejemplo, en anticuerpos IgG monoclonales tetraméricos humanos o humanizados. Como se describe más arriba, en algunas descripciones, la proteína de unión a CD16A incluye una región Fc que tiene una función efectora alterada, p. ej.,

5 afinidad reducida por un ligando efector tal como un receptor de Fc o componente C1 del complemento en comparación con la región Fc inalterada (p. ej., Fc de IgG1 de origen natural, proteínas). En una descripción, la región Fc no está glicosilada en el aminoácido de la región Fc correspondiente a la posición 297. Tales anticuerpos carecen de función efectora de Fc.

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

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

15 Las proteínas de unión a CD16A que se pueden utilizar en la práctica de la descripción incluyen proteínas que comprenden una secuencia de CDR derivada de (es decir, que tiene una secuencia igual o similar a) las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8. Los ADNc complementarios que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8, incluidas las secuencias que codifican CDR, se clonaron y secuenciaron como se describe. Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de 3G8 se proporcionan

20 a continuación. Utilizando la región variable de ratón y las secuencias de CDR, se produjo una gran cantidad de anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden regiones determinantes de la complementariedad derivadas de las CDR de 3G8 y se analizaron sus propiedades. Para identificar anticuerpos humanizados que se unen a CD16A con alta afinidad y tienen otras propiedades deseables, se produjeron cadenas pesadas de anticuerpo que comprenden una región VH con CDR derivadas de 3G8 y se combinaron (mediante

25 coexpresión) con cadenas ligeras de anticuerpo que comprenden una región VL con 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. Como se describe a continuación, se pueden utilizar proteínas de unión a CD16A que comprenden CDR de 3G8, tales como las proteínas de anticuerpos humanizados descritas en el presente documento.

30 5.1.2.1.1 Región VH

En una descripción, la proteína de unión a CD16A puede comprender un dominio variable de cadena pesada en el que al menos una CDR (y normalmente tres CDRS) tiene la secuencia de una CDR (y más típicamente las tres CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para el cual las porciones restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de y sustancialmente similares a la región variable de cadena pesada

35 de un anticuerpo o anticuerpos humanos).

También se describe un anticuerpo 3G8 humanizado o un fragmento de anticuerpo que contiene CDR derivadas del anticuerpo 3G8 en un marco sustancialmente humano, pero en los que al menos una de las CDR del dominio variable de cadena pesada tiene una secuencia que difiere de la CDR de cadena pesada del anticuerpo 3G8 de ratón correspondiente. Por ejemplo, en una descripción, la CDR o las CDR difieren de la secuencia de CDR de 3G8 al

40 menos por tener una o más sustituciones de CDR que se sabe en la técnica que afectan a la unión de 3G8 a CD16A, como se conoce en la técnica o como se divulga en las Tablas 3 y 4A-H. Las proteínas de unión a CD16 adecuadas pueden comprender 0, 1, 2, 3 o 4 o más de estas sustituciones (y a menudo tienen de 1 a 4 de estas sustituciones) y opcionalmente también pueden tener sustituciones adicionales.

Tabla 3. Sustituciones del dominio V_H

Núm.	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

Núm.	Posición de Kabat	Región	Sustituciones
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe o Tyr o Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln o Lys o Ala o His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Tabla 4A. Secuencias V_h derivadas de V_h 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

ES 2 971 647 T3

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
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
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

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-38	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>F</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-39	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>I</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-40	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>G</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-41	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>J</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-42	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-43	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>C</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-44	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
Hu3G8VH-45	<u>E</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>J</u>	<u>D</u>	<u>B</u>
*Las letras en la Tabla 4A se refieren a secuencias en las Tablas 4 B-H.							

TABLA 4B

FR1							
A	B	C	D	E			RESTO
Q	Q	Q	Q	Q			1
V	V	V	V	I			2
T	T	T	T	T			3
L	L	L	L	L			4
K	R	K	R	K			5
E	E	E	E	E			6
S	S	S	S	S			7
G	G	G	G	G			8
P	P	P	P	P			9
G	A	A	A	T			10
I	L	L	L	L			11
L	V	V	V	V			12
Q	K	K	K	K			13

FR1						
A	B	C	D	E		RESTO
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
30	31	32	33	34		SEQ ID NO

TABLA 4C

CDR1			
A	B		RESTO
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
35	36		SEQ ID NO

TABLA 4D

FR2			
A	B		RESTO
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47

FR2		
A	B	RESTO
L	L	48
A	A	49
37	38	SEQ ID NO

TABLA 4E

CDR2										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
H	H	H	H	H	L	H	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

TABLA 4F

FR3										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	RESTO
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
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
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

FR3											
A	B	C	D	E	F	G	H	I	j		RESTO
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q		94
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		SEQ ID NO

TABLA 4G

CDR3					
A	B	C	D		RESTO
I	I	I	I		95
N	N	N	N		96
P	P	P	P		97
A	A	A	A		98
W	W	Y	Y		99
F	F	F	F		100
A	D	A	D		101
Y	Y	Y	Y		102
59	60	61	62		SEQ ID NO

TABLA 4H

FR4		
A	B	RESTO
W	W	103
G	G	104
Q	Q	105
G	G	106
T	T	107
L	L	108
V	V	109
T	T	110
V	V	111
S	S	112
A	S	113
63	64	SEQ ID NO

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

Los dominios VH ilustrativos de proteínas de unión a CD 16 tienen la secuencia de 3G8VH, Hu3G8VH-5 y Hu3G8VH-22 (SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:72, respectivamente). Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican las secuencias de 3G8VH y Hu3G8VH-5 (SEQ ID NO:81 y SEQ ID NO:71, respectivamente) se proporcionan en SEQ ID NO:82 y SEQ ID NO:83, respectivamente.

El dominio VH puede tener una secuencia que difiere de la de Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO:70) en al menos uno, 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 una mayor afinidad por CD16A y/o reducen la inmunogenicidad de una proteína de unión a CD16A cuando se administran a seres humanos. En ciertas descripciones, el grado de identidad de secuencia con el dominio VH de Hu3G8VH-1 en las posiciones restantes es al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 98%.

A modo de ilustración y sin limitación, en la Tabla 4 se muestran las secuencias de varios dominios VH de la proteína de construcción de CD16A. Las cadenas pesadas que comprenden estas secuencias fusionadas a una región constante Cy1 humana se coexpresaron con la cadena ligera de hu3G8VL-1 (descrita a continuación) para formar anticuerpos tetraméricos y se midió la unión de los anticuerpos a 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 unión de alta afinidad, mostrando los dominios VH de hu3G8VH-6 y -40 una unión intermedia. Se considera que las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VH de

hu3G8VH-5 y hu3G8VH-22 (SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:72, respectivamente) tienen propiedades de unión particularmente favorables.

5.1.2.2 Región VL

Se realizaron estudios similares para identificar secuencias de dominio variable de cadena ligera con propiedades de unión favorables. Se puede proporcionar una proteína de unión a CD16A que contiene un dominio variable de cadena ligera en el que al menos una CDR (y habitualmente tres CDR) tiene la secuencia de una CDR (y más típicamente las tres CDR) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón 3G8 y para la que las porciones restantes de la proteína de unión son sustancialmente humanas (derivadas de, y sustancialmente similares a, la región variable de cadena pesada de uno o varios anticuerpos humanos).

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

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

Tabla 5. Sustituciones del dominio VL de 3G8

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

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

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3 G8 VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3 G8 VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3 G8 VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3 G8 VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3 G8 VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3 G8 VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3 G8 VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3 G8 VL-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
Hu3 G8 VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3 G8 VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3 G8 VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3 G8 VL-23	B	C	A	D	B	E	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3 G8 VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3 G8 VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3 G8 VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3 G8 VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3 G8 VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3 G8 VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3 G8 VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3 G8 VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3 G8 VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3 G8 VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3 G8 VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3 G8 VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3 G8 VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3 G8 VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3 G8 VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3 G8 VL-39	B	C	A	I	B	D	B
Hu3 G8 VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3 G8 VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3 G8 VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3 G8 VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3 G8 VL-44	B	A	A	K	B	A	B
*Las letras en la Tabla 6A se refieren a secuencias en las Tablas 6B-H.							

TABLA 6B

FR1			
A	B		RESTO
D	D		1
T	I		2
V	V		3
L	M		4
T	T		5
Q	Q		6
S	S		7
P	P		8
A	D		9
S	S		10
L	L		11
A	A		12
V	V		13
S	S		14
L	L		15
G	G		16
Q	E		17
R	R		18
A	A		19
T	T		20
I	I		21
S	N		22
C	C		23
65	66		SEQ ID NO

TABLA 6C

CDR1							
A	B	C	D	E	F	G	RESTO
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
67	68	69	70	71	72	73	SEQ ID NO

TABLA 6D

FR2		
A		RESTO
W		35
Y		36
Q		37
Q		38
K		39
P		40
G		41
Q		42
P		43
P		44
K		45
L		46
L		47
I		48
Y		49
74		Número de ID de secuencia

TABLA 6E

CDR2											
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESTO
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53

CDR2											
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	RESTO
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	SEQ ID NO

TABLA 6F

FR3			
A	B		RESTO
G	G		57
I	V		58
P	P		59
A	D		60
R	R		61
F	F		62
S	S		63
A	G		64
S	S		65
G	G		66
S	S		67
G	G		68
T	T		69
D	D		70
F	F		71
T	T		72
L	L		73

FR3			
A	B		RESTO
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		RESTO
Q	Q	Q	Q	Q		89
Q	Q	Q	Q	Q		90
S	S	S	S	S		91
N	Y	Y	N	N		92
E	S	E	S	E		93

CDR3					
A	B	C	D	E	RESTO
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
88	89	90	91	92	SEQ ID NO

TABLA 6H

FR4			
A	B		RESTO
F	F		98
G	G		99
G	Q		100
G	G		101
T	T		102
K	K		103
L	L		104
E	E		105
I	I		106
K	K		107
93	94		SEQ ID NO

5 Los dominios VL ilustrativos de proteínas de unión a CD 16 tienen la secuencia de 3G8VL, Hu3G8VL-1 o Hu3G8VL-43 (SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:73 y SEQ ID NO:74, respectivamente) como se muestra en las Tablas 5 y 6. Se proporcionan secuencias de nucleótidos ilustrativos que codifican 3G8VL (SEQ ID NO:84) y Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO:73) en SEQ ID NO:85 y SEQ ID NO:86, respectivamente.

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

A modo de ilustración y sin limitación, en la Tabla 6 se muestran las secuencias de varios dominios VL de proteínas de unión a CD16A. Las cadenas ligeras que comprenden estas secuencias fusionadas a un dominio constante C κ humano fueron coexpresadas con una cadena pesada de Hu3G8VH (descrita anteriormente) para formar anticuerpos tetraméricos, y se midió la unión de los anticuerpos a CD16A para evaluar el efecto de las sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio VL de Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO:73). Las construcciones en donde 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 unión de alta afinidad y hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 y 41 mostraron una unión intermedia. Se considera que las proteínas de unión a CD16A que comprenden los dominios VL de hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 y hu3G8VL-43 tienen propiedades de unión particularmente favorables (SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75 y SEQ ID NO:74, respectivamente).

5.1.2.2.1 Combinaciones de dominios VL y/o VH

Como se sabe en la técnica y se describe en otra parte del presente documento, las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina pueden expresarse de forma recombinante en condiciones en las que se asocian para producir un diacuerpo, o pueden combinarse de esta manera in vitro. Por tanto, se apreciará que un dominio VL derivado de 3G8 descrito en el presente documento puede combinarse con un dominio VH derivado de 3G8 descrito en el presente documento para producir un diacuerpo de unión a CD16A, y se contemplan todas esas combinaciones.

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

Los expertos apreciarán que las secuencias de los dominios VL y VH descritas aquí pueden modificarse adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica tales como maduración de la afinidad (véase Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:551-67; Daugherty et al., 1998, Protein Eng. 11:825-32; Boder et 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 CD16A se pueden modificar utilizando técnicas de maduración de la afinidad para identificar proteínas con mayor afinidad por CD16A y/o menor afinidad por CD16B.

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

5.2 DIACUERPOS QUE COMPRENDEN REGIONES Fc O PORCIONES DE LAS MISMAS

La descripción abarca moléculas de diacuerpos que comprenden dominios Fc o porciones de los mismos (p. ej., un dominio CH2 o CH3). En ciertas descripciones, el dominio Fc, o porción o porciones del mismo, comprenden uno o más dominios constantes de la región Fc de IgG2, IgG3 o IgG4 (p. ej., CH2 o CH3). En otras descripciones, la descripción abarca moléculas que comprenden un dominio Fc o una porción del mismo, en donde dicho dominio Fc o porción del mismo comprende al menos una modificación de aminoácido (p. ej. sustitución) con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje comparable o porción del mismo. Los dominios Fc variantes son bien conocidos en la técnica y se utilizan principalmente para alterar el fenotipo del anticuerpo que comprende dicho dominio Fc variante según se analiza en cualquiera de los ensayos de actividad de unión o función efectora bien conocidos en la técnica. p. ej. ELISA, análisis SPR o ADCC. Tales dominios Fc variantes, o porciones de los mismos, tienen uso en la presente descripción al conferir o modificar la función efectora exhibida por una molécula de diacuerpo de la descripción que comprende un dominio Fc (o porción del mismo) como se analizó funcionalmente, p. ej., en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Las variantes del dominio Fc identificadas como alteradoras de la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional WO04/063351, las Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0037000 y 2005/0064514, y Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 11/271.140 (Publicación Núm. US 2006-0134709 A1), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación Núm. US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los Autores de la presente invención.

En otras descripciones, la descripción abarca el uso de cualquier variante de Fc conocida en la técnica, tal como las divulgadas por 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 y cols., 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; documentos US 5.624.821; US 5.885.573; US 6.194.551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572.

En ciertas descripciones, dichas una o más modificaciones de los aminoácidos de la región Fc reducen la afinidad y avidez de la región Fc y, por tanto, de la molécula de diacuerpo de la descripción, por uno o más receptores FcγR. En una descripción específica, la descripción abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIIA. En otra descripción específica, la descripción abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIA. En otra descripción específica, la descripción abarca diacuerpos que comprenden una región Fc variante, o porción de la misma, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje, cuya región Fc variante solo se une a un FcγR, en donde dicho FcγR es FcγRIIB. En ciertas descripciones, la descripción abarca moléculas que comprenden un dominio Fc variante en donde dicha variante confiere o media una mayor actividad ADCC y/o una mayor unión a FcγRIIA (CD32A), con respecto a una molécula que no comprende ningún dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo salvaje, medidas utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica y descritos en el presente documento. En descripciones alternativas, la descripción abarca moléculas que comprenden un dominio Fc variante en donde dicha variante confiere o media una disminución de actividad ADCC (u otra función efectora) y/o un aumento de unión a FcγRIIB (CD32B), con respecto a una molécula que no comprende ningún dominio Fc o que comprende un dominio Fc de tipo salvaje, medidas utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica 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 IgG. Como se sabe en la técnica, la modificación de aminoácidos de la región Fc puede afectar profundamente a la función efectora y/o la actividad de unión mediadas por Fc. Sin embargo, estas alteraciones en las características funcionales pueden refinarse y/o manipularse adicionalmente cuando se implementan en el contexto de isotipos de IgG seleccionados. De manera similar, las características nativas del isotipo de Fc pueden manipularse mediante una o más modificaciones de aminoácidos. Los múltiples isotipos de IgG (es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) exhiben diferentes propiedades físicas y funcionales, incluida la semivida sérica, la fijación del complemento, las afinidades de unión a FcγR y las actividades de la función efectora (p. ej. ADCC, CDC) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus dominios bisagra y/o Fc. En ciertas descripciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG se seleccionan independientemente basándose en sus respectivas actividades de unión y/o función efectora separadas para modificar genéticamente un diacuerpo con las características deseadas. En la mayoría de las descripciones, dichas modificaciones de aminoácidos y regiones bisagra/Fc de IgG se han analizado por separado para determinar la actividad de unión y/o función efectora como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica en el contexto de una IgG1. En ciertas descripciones, dicha modificación de aminoácidos y región bisagra/Fc de IgG muestran una funcionalidad similar, p. ej., mayor afinidad por FcγRIIA, cuando se analiza por separado la unión de FcγR o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contiene Fc (p. ej. una inmunoglobulina). La combinación de dicha modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG seleccionada actúa después de forma aditiva o, más preferiblemente, sinérgicamente para modificar dicha funcionalidad en la molécula de diacuerpo de la descripción, con respecto a una molécula de diacuerpo de la descripción que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras descripciones, dicha modificación de aminoácidos y región Fc de IgG muestran funcionalidades opuestas, por ejemplo, aumento y disminución, respectivamente, de la afinidad por FcγRIIA, cuando se analizan por separado para determinar la unión a FcγR y/o la función efectora en el contexto de la molécula de diacuerpo u otra molécula que contenga Fc (p. ej., una inmunoglobulina) que comprende una región Fc de tipo salvaje como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica; la combinación de dicha modificación de aminoácido "opuesta" y la región IgG seleccionada actúa después para atemperar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en el diacuerpo de la descripción con respecto a un diacuerpo de la descripción que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo. También se describen regiones Fc variantes que comprenden combinaciones de modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica y regiones de IgG seleccionadas que exhiben nuevas propiedades, cuyas propiedades no fueron detectables cuando dichas modificaciones y/o regiones se analizaron independientemente como se describe en el presente documento.

Las características funcionales de los múltiples isotipos de IgG y sus dominios son bien conocidas en la técnica. Las secuencias de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se presentan en las FIGs. 1A-1B. La selección y/o combinaciones de dos o más dominios de isotipos de IgG específicos para su uso en los métodos del presente documento pueden basarse en cualquier parámetro conocido de los isotipos parentales, incluida la afinidad por FcγR (Tabla 7; Flesch y Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chapell et al., 1993, J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chapell et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040). Por ejemplo, el uso de regiones o dominios de isotipos de IgG que exhiben unión limitada o nula a FcγRIIB, p. ej., IgG2 o IgG4 pueden encontrar un uso particular cuando se desea modificar genéticamente un diacuerpo para maximizar la unión a un receptor activador y minimizar la unión a un receptor inhibidor. De manera similar, el uso de regiones o dominios Fc de isotipos de IgG que se sabe que se unen preferentemente a C1q o FcγRIIIA, p. ej., IgG3 (Brüggemann et al., 1987, J. Exp. Med. 166:1351-1361), se puede combinar con modificaciones de aminoácidos de Fc conocidas en la técnica para mejorar la ADCC, para modificar

genéticamente una molécula de diacuerpo de manera que la actividad de la función efectora, p. ej., activación del complemento o ADCC, se maximice.

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

Receptor	Afinidad estimada por IgG (M ⁻¹)	Afinidad relativa
FcγRI	10 ⁸ - 10 ⁹	IgG3>IgG1>>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIIA R ¹³¹ A	<10 ⁷	IgG3 >IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
FcγRIIA H ¹³¹ A	<10 ⁷	IgG3>IgG1>IgG2 sin unión: IgG4
FcγRIIB A	<10 ⁷	IgG3>IgG1>IgG4 sin unión: IgG2
FcγRIII	<10 ⁷	IgG3=IgG1 sin unión: IgG2, IgG4
A se une sólo a IgG complejada		

5

5.3 PRODUCTOS CONJUGADOS MOLECULARES

Las moléculas de diacuerpo de la descripción pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado; o porción del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido para generar proteínas de fusión. No es necesario que la fusión sea directa, sino que puede ocurrir a través de secuencias conectoras.

10

Adicionalmente, las moléculas de diacuerpo de la descripción (es decir, polipéptidos) pueden conjugarse con un agente terapéutico o un radical farmacológico que modifica una respuesta biológica determinada. Como alternativa a la conjugación directa, debido a los sitios de unión a epítopos múltiples en las moléculas de diacuerpos multivalentes, p. ej., tetravalentes de la descripción, se puede diseñar al menos una región de unión del diacuerpo para que se una al agente terapéutico o radical farmacológico deseado sin afectar a la unión del diacuerpo.

15

Los agentes terapéuticos o radicales farmacológicos no deben considerarse limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el radical farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posean una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina y proteína antiviral de hierba carmín, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones que incluyen, pero sin limitarse a, interferón α (IFN-α), interferón β (IFN-β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (p. ej., TNF-α, TNF-β, AIM I como se divulga en la Publicación PCT Núm. WO 97/33899), AIM II (véase, Publicación PCT Núm. WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., J. Immunol., 6:1567-1574, 1994), y VEGF (Publicación PCT Núm. WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (p. ej., angiostatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina (p. ej., interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF") o un factor de crecimiento (p. ej., hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

20

25

30

Las moléculas de diacuerpo de la descripción (es decir, polipéptidos) pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En descripciones 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 otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como describen Gentz et al., 1989, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 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 sin limitarse a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., Cell, 37:767 1984) y la etiqueta "flag" (Knappik et al., Biotechniques, 17(4):754-761, 1994).

35

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominadas colectivamente "barajado de ADN"). Se puede emplear el barajado de ADN para alterar las actividades de las moléculas de la descripción (p. ej., sitios de unión a epítopos

40

con afinidades más altas y tasas de disociación más bajas). Véanse, generalmente, las Patentes de Estados Unidos Núm. 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 diacuerpo de la descripción, o los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la descripción, pueden alterarse adicionalmente sometiéndolas a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Se pueden recombinar una o más porciones de un polinucleótido que codifica una molécula de la descripción con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

La presente descripción también abarca moléculas de diacuerpos de la descripción conjugadas o que reconocen inmuno-específicamente un agente diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la cual se desea aumentar/disminuir la semivida sérica y/o dirigir a un subconjunto particular de células. Las moléculas de la descripción se pueden utilizar con fines de diagnóstico, por ejemplo, para controlar el desarrollo o la progresión de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de prueba clínica para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. La detección puede facilitarse acoplando las moléculas de la descripción a una sustancia detectable o mediante el reconocimiento inmuno-específico de las moléculas de la sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente con las moléculas de la descripción o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) utilizando mecanismos conocidos en la técnica, o la molécula puede reconocer inmuno-específicamente la sustancia detectable: unión inmuno-específica de dicha sustancia. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Tales diagnóstico y detección se pueden lograr diseñando las moléculas para que reconozcan inmuno-específicamente la sustancia detectable o acoplando las moléculas de la descripción a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitarse a, diversas enzimas, incluyendo las enzimas, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitarse a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes tales como, pero sin limitarse a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; material luminiscente tal como, pero sin limitarse a, luminol; materiales bioluminiscentes tales como, pero sin limitarse a, luciferasa, luciferina y aequerina; material radiactivo tal como, pero sin limitarse a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutemio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn); metales emisores de positrones mediante diversas tomografías por emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Las moléculas de diacuerpo de la descripción pueden reconocer inmuno-específicamente o estar conjugadas con un radical terapéutico tal como una citotoxina (p. ej., un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (p. ej., emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estrepto-zotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Por otra parte, una molécula de diacuerpo de la descripción puede conjugarse o diseñarse para reconocer inmuno-específicamente radicales terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos (véase más arriba para ejemplos de materiales radiactivos). En ciertas descripciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede anclarse al polipéptido mediante una molécula conectora. Tales moléculas conectoras son comúnmente conocidas en la técnica y son descritas por 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 conjugar tales radicales terapéuticos con polipéptidos, incluyendo p. ej., los dominios Fc son bien conocidos; véanse, p. ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pág. 243-56, Alan R. Liss, Inc.; Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pág. 623-53, Marcel Dekker, Inc.; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, pág. 475-506; "Analysis, Results, And

Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pág. 303-16, Academic Press; y Thorpe et al., Immunol. Rev., 62:119-58, 1982.

La molécula de diacuerpo de la descripción puede administrarse con o sin un radical terapéutico conjugado con la misma, administrarse sola o combinada con uno o más factores citotóxicos y/o citocinas para su uso como tratamiento terapéutico. Cuando se administra solo, al menos un epítipo de una molécula de diacuerpo multivalente, p. ej., tetravalente, puede diseñarse para que reconozca inmuno-específicamente un agente terapéutico, p. ej., uno o más factores citotóxicos y/o citocinas, que pueden administrarse de forma concurrente o posterior a la molécula de la descripción. De esta manera, la molécula de diacuerpo puede dirigirse específicamente al agente terapéutico de una manera similar a la conjugación directa. Alternativamente, una molécula de la descripción puede conjugarse con un anticuerpo para formar un producto heteroconjugado de anticuerpo como describe Segal en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.676.980. Las moléculas de diacuerpo de la descripción también pueden anclar a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE MOLÉCULAS DEL DIACUERPO

Las moléculas de diacuerpos de la presente descripción se pueden caracterizar de diversas formas. En particular, se pueden analizar las moléculas de la descripción para determinar la capacidad de unirse inmuno-específicamente a un antígeno, p. ej., FcR1IIIA o FcR1IIB, o, cuando la molécula comprende un dominio Fc (o porción del mismo) la capacidad de exhibir interacciones Fc-FcYR, es decir unión específica de un dominio Fc (o porción del mismo) a un FcYR. Tal ensayo puede realizarse en solución (p. ej., Houghten, Bio/Techniques, 13:412-421, 1992), en cuentas (Lam, Nature, 354:82-84, 1991, en chips (Fodor, Nature, 364:555-556, 1993), en bacterias (Patente de Estados Unidos Núm. 5.223.409), en esporas (Patentes de Estados Unidos Núm. 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, Science, 249:386-390, 1990; Devlin, Science, 249:404-406, 1990; Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382, 1990; y Felici, J. Mol. Biol., 222:301-310, 1991). Las moléculas que se ha identificado que se unen inmuno-específicamente a un antígeno, p. ej., FcYR1IIIA, puede analizarse después para determinar su especificidad y afinidad por el antígeno.

Las moléculas de la descripción que han sido diseñadas para que comprendan dominios de unión a epítopos múltiples pueden analizarse para determinar la unión inmuno-específica a uno o más antígenos (p. ej., antígeno canceroso y reactividad cruzada con otros antígenos (p. ej., FcYR)) o, cuando las moléculas comprenden un dominio Fc (o porción del mismo) las interacciones Fc-FcYR mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar para analizar la unión inmuno-específica, la reactividad cruzada y las interacciones Fc-FcYR incluyen, pero sin limitarse a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar sólo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica. (véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

La afinidad de unión y la tasa de disociación de la interacción del dominio de unión al antígeno o de la interacción Fc-FcYR se pueden determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de un antígeno marcado, tal como FcYR tetramérico (p. ej., ^3H o ^{125}I , véase la Sección 5.4.1) con una molécula de interés (p. ej., moléculas de la presente descripción que comprenden dominios de unión a epítopos múltiples en presencia de cantidades crecientes de epítopos no marcados, tales como FcYR 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 descripción por un antígeno y las tasas de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación mediante análisis de Scatchard.

Las afinidades y propiedades de unión de las moléculas de la descripción para un antígeno o FcYR pueden determinarse inicialmente utilizando ensayos *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para interacciones del dominio de unión a antígeno o Fc-FcYR, que incluyen, pero sin limitarse a, ensayo ELISA, ensayo de resonancia de plasmón de superficie y ensayos de inmunoprecipitación. Preferiblemente, las propiedades de unión de las moléculas de la descripción también se caracterizan por ensayos funcionales *in vitro* para determinar una o más funciones de las células efectoras mediadoras de FcYR, como se describe en la sección 5.4.2. En las descripciones más preferidas, las moléculas de la descripción tienen propiedades de unión en los modelos *in vivo* (tales como los descritos y divulgados en el presente documento) similares a las de los ensayos *in vitro*. Sin embargo, la presente descripción no excluye moléculas de la descripción que no exhiben el fenotipo deseado en ensayos *in vitro*, pero exhiben el fenotipo deseado *in vivo*.

En algunas descripciones, el escrutinio y la identificación de moléculas que comprenden dominios de unión a epítopos múltiples y, opcionalmente, dominios Fc (o porciones de los mismos) se realizan mediante ensayos de base funcional, preferiblemente en modo de alto rendimiento. Los ensayos de base funcional pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcYR, tales como las descritas

en el presente documento en las Secciones 5.4.2 y 5.4.3. Los ejemplos no limitantes de funciones de células efectoras que pueden utilizarse según los métodos del presente documento incluyen, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En una descripción preferida, el análisis cinético BIAcore se utiliza para determinar las tasas de activación y desactivación de unión de moléculas de la presente descripción a un antígeno o FcγR. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y disociación de un antígeno o FcγR a partir de chips con moléculas inmovilizadas (p. ej., moléculas que comprenden dominios de unión a epítomos o dominios Fc (o porciones de los mismos), respectivamente) sobre su superficie. El análisis BIAcore se describe en la Sección 5.4.3.

Preferiblemente, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), utilizando cualquiera de los mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, se utiliza para ensayos inmunológicos o de base funcional para caracterizar moléculas de la descripción. Los clasificadores de flujo son capaces de examinar rápidamente una gran cantidad de células individuales que han sido unidas, p. ej., opsonizadas, por moléculas de la descripción (p. ej., 10-100 millones de células por hora) (Shapiro et al., *Practical Flow Cytometry*, 1995). Adicionalmente, los parámetros específicos utilizados para optimizar el comportamiento de los diacuerpos incluyen, pero sin limitarse a, la concentración de antígeno (es decir, complejo tetramérico FcγR, véase la Sección 5.4.1), el tiempo de competición cinética o rigurosidad de FACS, cada uno de los cuales puede variarse para seleccionar las moléculas de diacuerpo que comprenden moléculas de la descripción que exhiben propiedades de unión específicas, p. ej., unión simultánea a múltiples epítomos. Los citómetros de flujo para clasificar y examinar células biológicas son bien conocidos en la técnica. Los citómetros de flujo conocidos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 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.

La caracterización de la afinidad de unión al antígeno diana o la afinidad de unión Fc-FcγR y la evaluación de la densidad del antígeno diana o de FcγR en una superficie celular se pueden realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como el análisis de Scatchard o mediante el uso de kits según las instrucciones del fabricante, tal como Quantum™ Simply Celular® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Los uno o más ensayos funcionales pueden ser cualquier ensayo conocido en la técnica para caracterizar una o más funciones de células efectoras mediadas por FcγR como lo conoce un experto en la técnica o se describe en el presente documento. En descripciones específicas, las moléculas de la descripción que comprenden dominios de unión a epítomos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo) se analizan en un ensayo ELISA para determinar la unión a uno o más antígenos diana o uno o más FcγR, p. ej., FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIA; seguido de uno o más ensayos de ADCC. En algunas descripciones, las moléculas de la descripción se analizan adicionalmente utilizando un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie, p. ej., BIAcore. Los ensayos basados en resonancia de plasmones de superficie son bien conocidos en la técnica y se comentan con más detalle en la Sección 5.4.3 y se ilustran en el presente documento, p. ej., en el ejemplo 6.1.

En las descripciones más preferidas, las moléculas de la invención que comprenden dominios de unión a epítomos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo) se caracterizan adicionalmente en un modelo animal para la interacción con un antígeno diana (p. ej., un FcγR) o para la interacción Fc-FcγR. Cuando se van a evaluar las interacciones Fc-FcγR, los modelos animales preferidos para su uso en los métodos del presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos, p. ej., cualquier modelo de ratón descrito en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.877.397, y 6.676.927. Otros ratones transgénicos para su uso en tales métodos incluyen, pero sin limitarse a, ratones con FcγRIIIA inactivado desnudos que portan FcγRIIIA humano; ratones con FcγRIIIA inactivado desnudos que portan FcγRIIA humano; ratones con FcγRIIIA inactivado desnudos que portan FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones con FcγRIIIA inactivado desnudos que portan FcγRIIB humano y FcγRIIA humano; ratones con FcγRIIIA y FcγRIIA inactivados desnudos que portan FcγRIIIA y FcγRIIA humanos y ratones con FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB inactivados desnudos que portan FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRIIB humanos.

5.4.1 ENSAYOS DE UNIÓN QUE COMPRENDEN FcγR

La caracterización de la unión a FcγR mediante moléculas que comprenden un dominio Fc (o porción del mismo) y/o que comprenden un dominio de unión a epítopo específico para un FcγR se puede realizar utilizando cualquier FcγR, incluyendo, pero sin limitarse a, variantes polimórficas de FcγR. En algunas descripciones, se utiliza una variante polimórfica de FcγRIIIA, que contiene una fenilalanina en la posición 158. En otras descripciones, la caracterización se realiza utilizando una variante polimórfica de FcγRIIIA que contiene una valina en la posición 158. FcγRIIIA 158V muestra una mayor afinidad por IgG1 que 158F y una mayor actividad ADCC (véanse, p. ej., Koene et al., 1997, *Blood*, 90:1109-14; Wu et al., 1997, *J. Clin. Invest.* 100: 1059-70); de hecho, este resto interactúa directamente con la región bisagra inferior de IgG1, como lo demuestran recientemente los estudios de co-cristalización de IgG1-FcγRIIIA, véase, p. ej., Sonderman et al., 2000, *Nature*, 100: 1059-70. Los estudios han demostrado que, en algunos casos, los anticuerpos terapéuticos tienen una mejor eficacia en pacientes homocigotos para FcγRIIIA-158V. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20 Rituximab fue terapéuticamente más eficaz en pacientes homocigotos para FcγRIIIA158V en comparación con pacientes homocigotos para FcγRIIIA 158F (Véase, p. ej., Cartron et al., 2002

Blood, 99(3): 754-8). En otras descripciones, las moléculas terapéuticas que comprenden esta región también pueden ser más eficaces en pacientes heterocigotos para FcγRIIIA-158V y FcγRIIIA-158F, y en pacientes con FcγRIIA-131H. Aunque no se pretende limitarse a un mecanismo de acción particular, la selección de moléculas de la descripción con alotipos alternativos puede proporcionar variantes que una vez modificadas genéticamente a diacuerpos terapéuticos serán clínicamente más eficaces para pacientes homocigotos para dicho alotipo.

Se desarrolló un ensayo de unión a FcγR para determinar la unión de las moléculas de la descripción a FcγR y, en particular, para determinar la unión de dominios Fc a FcγR. El ensayo permitió la detección y cuantificación de las interacciones Fc-FcγR, a pesar de la afinidad inherentemente débil del receptor por su ligando, p. ej., en el rango micromolar para FcγRIIB y FcγRIIA. El método se describe en detalle en la Solicitud Internacional WO04/063351 y en las Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0037000 y 2005/0064514. Brevemente, el método implica la formación de un complejo de FcγR que puede utilizarse en cualquier inmunoensayo convencional conocido en la técnica, p. ej., FACS, ELISA, resonancia de plasmón de superficie, etc. Adicionalmente, el complejo de FcγR tiene una mayor avidez por una región Fc, con respecto a un FcγR no complejo. Según la descripción, el complejo molecular preferido es un complejo inmunológico tetramérico, que comprende: (a) la región soluble de FcγR (p. ej., la región soluble de FcγRIIA, FcγRII o FcγRIIB); (b) una secuencia AVITAG biotinilada de 15 aminoácidos (AVITAG) conectada operablemente al extremo C de la región soluble de FcγR (p. ej., la región soluble de FcγRIIA, FcγRII o FcγRIIB); y (c) estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE); a una razón molar para formar un complejo de FcγR tetramérico (preferiblemente a una razón molar de 5:1). La proteína de fusión se biotinila enzimáticamente, utilizando, por ejemplo, la enzima Bir A de *E. coli*, una biotina ligasa que biotinila específicamente un resto de lisina en la secuencia AVITAG de 15 aminoácidos. Las proteínas FcγR solubles biotiniladas se mezclan a continuación con SA-PE a una razón molar de 1X SA-PE:5X FcγR soluble biotinilado para formar un complejo de FcγR tetramérico.

Se ha demostrado que los polipéptidos que comprenden regiones Fc se unen a los complejos de FcγR tetraméricos con al menos una afinidad 8 veces mayor que el FcγR no complejo monomérico. La unión de polipéptidos que comprenden regiones Fc a los complejos de FcγR tetraméricos se puede determinar utilizando mecanismos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayos, ensayos ELISA, etc.

También se describe el uso de los complejos inmunológicos que comprenden moléculas de la descripción, y formados según los métodos descritos anteriormente, para determinar la funcionalidad de moléculas que comprenden una región Fc en ensayos basados en células o libres de células.

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

5.4.2 ENSAYOS FUNCIONALES DE MOLÉCULAS CON CADENAS PESADAS VARIANTES

También se describe la caracterización de las moléculas de la descripción que comprenden dominios de unión a epítopos múltiples y, opcionalmente, dominios Fc (o porciones de los mismos) utilizando ensayos conocidos por los expertos en la técnica para identificar la función de las células efectoras de las moléculas. También se describe la caracterización de las moléculas de la descripción para la función de células efectoras mediada por FcγR. Adicionalmente, cuando al menos uno de los antígenos diana de la molécula de diacuerpo de la descripción es un FcγR, la unión del FcγR mediante la molécula de diacuerpo puede servir para activar vías mediadas por FcγR similares a las activadas por la unión de FcγR-Fc. Por lo tanto, cuando al menos un dominio de unión a epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce un FcγR, la molécula de diacuerpo puede provocar la función de la célula efectora mediada por FcγR sin contener un dominio Fc (o porción del mismo), o sin unión concomitante de Fc-FcγR. Los ejemplos de funciones de células efectoras que pueden analizarse incluyen, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión a C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento. Se puede utilizar cualquier ensayo basado en células o libre de células conocido por los expertos en la técnica para determinar la actividad de la función de las células efectoras (para ensayos de células efectoras, véanse Perusia 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 EJ. 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 descripción, las moléculas de la descripción se pueden analizar para determinar la fagocitosis mediada por FcγR en monocitos humanos. Alternativamente, la fagocitosis mediada por FcγR de las moléculas de la descripción puede analizarse en otros fagocitos, p. ej., neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares; PMN); monocitos de sangre periférica humana, macrófagos derivados de monocitos, que pueden obtenerse utilizando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., véase Brown EJ. 1994, *Methods Cell Biol.*, 45: 147-164.). En una descripción, la función de las moléculas de la descripción se caracteriza midiendo la capacidad de las células THP-1 para fagocitar glóbulos rojos de oveja (SRBC) opsonizados con IgG fluoresceinada mediante métodos descritos previamente (Tridandapani et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 20480-7).

Otro ensayo ilustrativo para determinar la fagocitosis de las moléculas de la descripción es un ensayo de opsonofagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) que puede comprender lo siguiente: recubrir una biopartícula diana tal como *Escherichia coli* marcada con FITC (Molecular Probes) o *Staphylococcus aureus*-FITC con (i) anticuerpo 4-4-20 de tipo salvaje, un anticuerpo contra fluoresceína (Véase Bedzyk et al., 1989, J. Biol. Chem. 264(3): 1565-1569), como anticuerpo de control para ADCP dependiente de FcγR; o (ii) anticuerpo 4-4-20 que alberga la mutación D265A que anula la unión a FcγRIII, como control de fondo para ADCP dependiente de 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 a epítipo específico para FcγRIII; y formar la partícula opsonizada; añadir cualquiera de las partículas opsonizadas descritas (i-iii) a células efectoras THP-1 (una línea celular monocítica disponible en ATCC) a una razón de 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1, 100:1 para permitir que se produzca la fagocitosis mediada por FcγR; preferiblemente incubar las células y *E. coli*-FITC/anticuerpo a 37°C durante 1,5 horas; añadir azul tripán después de la incubación (preferiblemente a temperatura ambiente durante 2-3 minutos) a las células para extinguir la fluorescencia de las bacterias que están adheridas al exterior de la superficie celular sin ser internalizadas; transferir células a un tampón FACS (p. ej., BSA al 0,1%, en PBS, azida sódica al 0,1%), analizar la fluorescencia de las células THP1 mediante FACS (p. ej., BD FACS Calibur). Preferiblemente, las células THP-1 utilizadas en el ensayo se analizan mediante FACS para determinar la expresión de FcγR sobre la superficie celular. Las células THP-1 expresan tanto CD32A como CD64. CD64 es un FcγR de alta afinidad que se bloquea al realizar el ensayo de ADCP según los métodos del presente documento. Las células THP-1 se bloquean preferiblemente con 100 µg/ml de IgG1 soluble o con suero humano al 10%. Para analizar el alcance de ADCP, la ventana de análisis se coloca preferiblemente en células THP-1 y se mide la mediana de la intensidad de fluorescencia. La actividad ADCP para mutantes individuales se calcula y se notifica como un valor normalizado para el chMab 4-4-20 de tipo salvaje obtenido. Las partículas opsonizadas se añaden a las células THP-1 de manera que la razón entre las partículas opsonizadas y las células THP-1 sea 30:1 o 60:1. En las descripciones más preferidas, el ensayo ADCP se realiza con controles, tales como *E. coli*-FITC en medio, *E. coli*-FITC y células THP-1 (para que actúe como actividad ADCP independiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1 y anticuerpo 4-4-20 de tipo salvaje (para que actúe como actividad ADCP dependiente de FcγR), *E. coli*-FITC, células THP-1, 4-4-20 D265A (para que actúe como control de fondo para la actividad ADCP dependiente de FcγR).

En otra descripción, las moléculas de la descripción se pueden analizar para determinar la actividad ADCC mediada por FcγR en células efectoras, p. ej., células asesinas naturales, utilizando cualquiera de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (Véanse, p. ej., Perusia 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 ensayo ilustrativo para determinar la actividad ADCC de las moléculas de la descripción se basa en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que comprende: marcar células diana con [⁵¹Cr]Na₂CrO₄ (esta molécula que atraviesa la membrana celular se utiliza comúnmente para el marcaje, ya que se une a proteínas citoplasmáticas y, aunque se libera espontáneamente de las células con una cinética lenta, se libera masivamente después de la necrosis de la célula diana); opsonizar las células diana con las moléculas de la descripción que comprenden cadenas pesadas variantes; combinar las células diana opsonizadas radiomarcadas con células efectoras en una placa de microtitulación en una proporción apropiada de células diana a células efectoras; incubar la mezcla de células durante 16-18 horas a 37°C; recoger sobrenadantes; y analizar la radiactividad. La citotoxicidad de las moléculas de la descripción puede determinarse a continuación, por ejemplo utilizando la siguiente fórmula: % de lisis = (cpm experimental - cpm de fuga de la diana)/(cpm de lisis con detergente - cpm de fuga de la diana) x 100%. Alternativamente, % de lisis = (ADCC-AICC)/(liberación máxima-liberación espontánea). La lisis específica se puede calcular mediante la fórmula: lisis específica = % de lisis con las moléculas de la descripción - % de lisis en ausencia de las moléculas de la descripción. Se puede generar un gráfico variando o bien la razón diana:célula efectora o bien la concentración de anticuerpos.

Preferiblemente, las células efectoras utilizadas en los ensayos de ADCC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se purifican preferiblemente a partir de sangre humana normal, utilizando métodos convencionales conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque. Las células efectoras preferidas para su uso en los métodos del presente documento expresan diferentes receptores activadores de FcγR. También se describen células efectoras, THP-1, que expresan FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIB, y macrófagos primarios derivados de monocitos derivados de sangre humana completa que expresan tanto FcγRIIA como FcγRIIB, para determinar si los mutantes de anticuerpos de cadena pesada muestran una mayor actividad de ADCC y fagocitosis con respecto a anticuerpos IgG1 de tipo salvaje.

La línea celular de monocitos humanos, THP-1, activa la fagocitosis mediante 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 FcγRIIA o FcγRIIB. La estimulación de estas células con citocinas afecta al patrón de expresión de FcR (Pricop et al., 2000 J. Immunol. 166: 531-7). El crecimiento de células THP-1 en presencia de la citocina IL4 induce la expresión de FcγRIIB y provoca una reducción en la expresión de FcγRIIA y FcγRI. La expresión de FcγRIIB también puede mejorarse mediante una mayor densidad celular (Tridandapani et al., 2002, J. Biol. Chem. 277: 5082-9). Por el contrario, se ha informado de que IFNγ puede conducir a la expresión de FcγRIIA (Pearse et al., 1993 PNAS USA 90: 4314-8). La presencia o ausencia de receptores en la superficie celular se puede determinar mediante FACS utilizando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. La expresión de FcγR inducida por citocinas en la superficie celular proporciona un sistema para probar tanto la activación como la inhibición en presencia de FcγRIIB. Si las células THP-1 no pueden expresar FcγRIIB, se puede utilizar otra línea celular de monocitos humanos, U937.

Se ha demostrado que estas células se diferencian terminalmente en macrófagos en presencia de IFN γ y TNF (Koren et al., 1979, Nature 279: 328-331).

La destrucción de células tumorales dependiente de Fc γ R está mediada por macrófagos y células NK en modelos de tumores de ratón (Clynes et al., 1998, PNAS USA 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 diana tanto en ensayos de fagocitosis como de ADCC. Los patrones de expresión de Fc γ R1, Fc γ R11A y Fc γ R11B se ven afectados por diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de Fc γ R a partir de monocitos elutriados congelados, monocitos elutriados recientes, monocitos mantenidos en FBS al 10% y monocitos cultivados en FBS + GM-CSF y/o en suero humano se puede determinar utilizando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden teñirse con anticuerpos específicos de Fc γ R y analizarse mediante FACS para determinar los perfiles de Fc γ R. A continuación, se utilizan las condiciones que mejor imitan la expresión de Fc γ R *in vivo* en macrófagos para los métodos del presente documento.

También se describe el uso de células de ratón, especialmente cuando no se pueden obtener células humanas con los perfiles de Fc γ R correctos. También se describe la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7(ATCC) que puede transfectarse con Fc γ R11A humano y transfectantes estables aislados utilizando métodos conocidos en la técnica, véase, p. ej., Ralph et al., J. Immunol. 119: 950-4). Los transfectantes se pueden cuantificar para determinar la expresión de Fc γ R11A mediante análisis FACS utilizando experimentación de rutina y se pueden utilizar altos expresores en los ensayos de ADCC descritos en el presente documento. También se describe el aislamiento de macrófagos peritoneales de bazo que expresan Fc γ R humano a partir de ratones transgénicos inactivados tales como los divulgados en el presente documento.

Los linfocitos se pueden recolectar de sangre periférica de donantes (PBM) utilizando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Dentro de la población mononuclear aislada de células, la mayor parte de la actividad ADCC se produce a través de las células asesinas naturales (NK) que contienen Fc γ R11A pero no Fc γ R11B en su superficie. Los resultados con estas células indican la eficacia de los mutantes para desencadenar la ADCC de células NK y establecer los reactivos para probar con monocitos elutriados.

Las células diana utilizadas en los ensayos de ADCC incluyen, pero sin limitarse a, líneas celulares de cáncer de mama, p. ej., SK-BR-3 con número de acceso ATCC HTB-30 (véase, p. ej., Tremp et al., 1976, Cancer Res. 33-41); linfocitos B; células derivadas de linfoma de Burkitt, p. ej., células Raji con número de acceso ATCC CCL-86 (véase, p. ej., Epstein et al., 1965, J. Natl. Cancer Inst. 34: 231-240), y células Daudi con número de acceso ATCC CCL-213 (véase, p. ej., Klein et al., 1968, Cancer Res. 28: 1300-10). Las células diana deben ser reconocidas por el sitio de unión al antígeno de la molécula de diacuerpo que se va a analizar.

El ensayo de ADCC se basa en la capacidad de las células NK para mediar la muerte celular mediante una vía apoptótica. Las células NK median la muerte celular en parte mediante el reconocimiento por parte de Fc γ R11A de un dominio Fc de IgG unido a un antígeno en la superficie celular. Los ensayos de ADCC utilizados según los métodos del presente documento pueden ser ensayos basados en radiactividad o ensayos basados en fluorescencia. El ensayo de ADCC utilizado para caracterizar las moléculas de la descripción que comprenden regiones Fc variantes comprende marcar células diana, p. ej., células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, Daudi, opsonizando las células diana con un anticuerpo que reconoce un receptor de la superficie celular en la célula diana a través de su sitio de unión al antígeno; combinar las células diana opsonizadas marcadas y las células efectoras en una razón adecuada, que puede determinarse mediante experimentación de rutina; recolectar las células; detectar la marca en el sobrenadante de las células diana lisadas, utilizando un esquema de detección apropiado basado en la marca utilizada. Las células diana pueden marcarse con una marca radiactiva o una marca fluorescente, utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, las marcas incluyen, pero sin limitarse a, [⁵¹Cr]Na₂CrO₄; y el éster acetoximetílico del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA).

En una descripción preferida específica, se utiliza un ensayo fluorimétrico de resolución temporal para medir la actividad de ADCC contra células diana que han sido marcadas con el éster acetoximetílico del ligando potenciador de la fluorescencia, 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato (TDA). Tales ensayos fluorimétricos son conocidos en la técnica, p. ej., véase, Blomberg et al., 1996, Journal of Immunological Methods, 193: 199-206. Brevemente, las células diana se marcan con el diéster acetoximetílico de TDA (2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (BATDA) que atraviesa la membrana, que se difunde rápidamente a través de la membrana celular de las células viables. Las esterasas intracelulares separan los grupos éster y la molécula de TDA que no atraviesa la membrana regenerada queda atrapada dentro de la célula. Después de la incubación de las células efectoras y diana, p. ej., durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo 5% de CO₂, el TDA liberado de las células diana lisadas se quela con Eu³⁺ y la fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (p. ej., Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

En otra descripción específica, el ensayo de ADCC utilizado para caracterizar las moléculas de la descripción que comprenden sitios de unión a epítopos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo) comprende las siguientes etapas: Preferiblemente 4-5x10⁶ las células diana (p. ej., células SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji) están marcadas con 2,2':6',2"-terpiridin-6-6"-dicarboxilato de bis(acetoximetilo) (Reactivo DELFIA BATDA, Perkin Elmer/Wallace). Para una eficacia de marcaje óptima, el número de células diana utilizadas en el ensayo de ADCC

preferiblemente no debe exceder de 5×10^6 . Se añade reactivo BATDA a las células y la mezcla se incuba a 37°C, preferiblemente bajo 5% de CO₂, durante al menos 30 minutos. A continuación, las células se lavan con un tampón fisiológico, p. ej., PBS con sulfinpirazol 0,125 mM y medios que contienen sulfinpirazol 0,125 mM. Las células diana marcadas se opsonizan (recubren) después con una molécula de la descripción que comprende un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIA y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo). En descripciones preferidas, la molécula utilizada en el ensayo de ADCC también es específica para un receptor de superficie celular, un antígeno tumoral o un antígeno canceroso. La molécula de diacuerpo de la invención puede unirse específicamente a cualquier antígeno canceroso o tumoral, tales como los enumerados en la sección 5.6.1. Las células diana en el ensayo de ADCC se eligen según los sitios de unión a epítipos modificados genéticamente en el diacuerpo de la descripción, de manera que el diacuerpo se une específicamente a un receptor de la superficie celular de la célula diana.

Las células diana se añaden a las células efectoras, p. ej., PBMC, para producir razones efector:diana de aproximadamente 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 o 100:1. Las células efectoras y diana se incuban durante al menos dos horas, hasta 3,5 horas, a 37°C, bajo 5% de CO₂. Los sobrenadantes celulares se recogen y se añaden a una solución ácida de europio (p. ej., Solución de europio DELFIA, Perkin Elmer/Wallace). La fluorescencia de los quelatos de europio-TDA formados se cuantifica en un fluorómetro de resolución temporal (p. ej., Víctor 1420, Perkin Elmer/Wallace). La liberación máxima (MR) y la liberación espontánea (SR) se determinan mediante la incubación de células diana con TX-100 al 1% y medio solo, respectivamente. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos (AICC) se mide mediante la incubación de células diana y efectoras en ausencia de una molécula de prueba, p. ej., diacuerpo de la descripción. Cada ensayo se realiza preferiblemente por triplicado. El porcentaje medio de lisis específica se calcula como: Liberación experimental (ADCC) - AICC/(MR-SR) x 100.

También se describe el uso de ensayos conocidos en la técnica, e ilustrados en el presente documento, para caracterizar la unión de C1q y la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por moléculas de la descripción que comprenden dominios Fc (o porciones de los mismos). Para determinar la unión de C1q, se puede realizar un ELISA de unión a C1q. Un ensayo ilustrativo puede comprender lo siguiente: las placas de ensayo se pueden recubrir durante la noche a 4°C con un polipéptido que comprende una molécula de la descripción o un polipéptido inicial (control) en tampón de recubrimiento. A continuación, se pueden lavar y bloquear las placas. Después del lavado, se puede añadir una alícuota de C1q humano a cada pocillo e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se pueden añadir a cada pocillo 100 µL de un anticuerpo de oveja anti-complemento C1q conjugado con peroxidasa y se pueden incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se puede lavar nuevamente con tampón de lavado y se pueden añadir a cada pocillo 100 µL de tampón de sustrato que contiene OPD (dihidroxloruro de O-fenilendiamina (Sigma)). La reacción de oxidación, que se observa por la aparición de un color amarillo, se puede dejar transcurrir durante 30 minutos y detenerse añadiendo 100 µL de H₂SO₄ 4,5 N. La absorbancia puede leerse a continuación a (492-405) nm.

Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). p. ej. como describen Gazzano-Santoro et al., en J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Brevemente, se pueden diluir con tampón diversas concentraciones de la molécula que comprende un dominio Fc (variante) (o una porción del mismo) y complemento humano. Las células que expresan el antígeno al que se une la molécula de diacuerpo pueden diluirse hasta una densidad de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Las mezclas de las moléculas de diacuerpo que comprenden un dominio Fc (variante) (o porción del mismo), complemento humano diluido y células que expresan el antígeno se pueden añadir a una placa de 96 pocillos de cultivo de tejido de fondo plano y dejar incubar durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. A continuación, se pueden añadir 50 µL de azul alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubar durante la noche a 37°C. La absorbancia se mide utilizando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades relativas de fluorescencia (URF). Las concentraciones de la muestra se pueden calcular a partir de una curva patrón y el porcentaje de actividad en comparación con la molécula no variante, es decir, una molécula que no comprende un dominio Fc o que comprende un dominio Fc no variante, se notifica para la variante de interés.

5.4.3 OTROS ENSAYOS

Las moléculas de la descripción que comprenden un dominio de unión a epítipos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc se pueden analizar utilizando cualquier ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie conocido en la técnica para caracterizar los parámetros cinéticos de un dominio de unión a antígeno o de unión a Fc-FcγR. Se puede utilizar cualquier aparato de SPR disponible comercialmente, incluidos, pero sin limitarse a, Biacore Instruments, disponible en Biacore AB (Uppsala, Suecia); aparatos IAsys disponibles en Affinity Sensors (Franklin, MA.); sistema IBIS disponible en Windsor Scientific Limited (Berk, Reino Unido), sistemas SPR-CELLIA disponibles en Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Japón) y el SPR Detector Spreeta disponible en Texas Instruments (Dallas, TX). Para una revisión de la tecnología basada en SPR véanse 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, está contemplado en los métodos cualquiera de los aparatos de SPR y métodos basados en SPR para medir las interacciones proteína-proteína descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.373.577; 6.289.286; 5.322.798; 5.341.215; 6.268.125.

Brevemente, los ensayos basados en SPR implican inmovilizar un miembro de un par de unión en una superficie y verificar 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 durante la formación o disociación del complejo. La superficie sobre la que se produce la inmovilización es el chip sensor, que es el núcleo de la tecnología SPR; consiste en una superficie de vidrio recubierta con una fina capa de oro y forma la base de una gama de superficies especializadas diseñadas para optimizar la unión de una molécula a la superficie. Se encuentran disponibles comercialmente una variedad de chips sensores, especialmente de las empresas enumeradas más arriba, todos los cuales pueden utilizarse en los métodos del presente documento. Los ejemplos de chips sensores incluyen los disponibles en BIAcore AB, Inc., p. ej., Sensor Chip CM5, SA, NTA y HPA. Una molécula de la descripción puede inmovilizarse sobre la superficie de un chip sensor utilizando cualquiera de los métodos y químicas de inmovilización conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a, acoplamiento covalente directo mediante grupos amina, acoplamiento covalente directo mediante grupos sulfhidrilo, anclaje de biotina a una superficie recubierta de avidina, acoplamiento de aldehído a grupos carbohidrato y anclaje a través de la etiqueta de histidina con chips NTA.

En algunas descripciones, los parámetros cinéticos de la unión de moléculas de la descripción que comprenden sitios de unión a epítopos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc, a un antígeno o un FcyR se pueden determinar utilizando un aparato BIAcore (p. ej., aparato BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, Nueva Jersey). Como se comenta más arriba, véase la sección 5.4.1, se puede utilizar cualquier FcyR para evaluar la unión de las moléculas de la descripción, donde al menos un sitio de unión al epítipo de la molécula de diacuerpo reconoce inmunoespecíficamente un FcyR, y/o donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o porción del mismo). En una descripción específica, el FcyR es FcyRIIIA, preferiblemente un FcyRIIIA monomérico soluble. Por ejemplo, en una descripción, el FcyRIIIA monomérico soluble es la región extracelular de FcyRIIIA unida a la secuencia de conector-AVITAG). En otra descripción específica, el FcyR es FcyRIIB, preferiblemente un FcyRIIB dimérico soluble.

Para todos los ensayos inmunológicos, el reconocimiento/unión de FcyR por una molécula de la descripción puede efectuarse mediante múltiples dominios: en ciertas descripciones, las moléculas de la descripción reconocen inmunoespecíficamente un FcyR a través de uno de los dominios de unión a epítopos múltiples; en otras descripciones más, cuando la molécula de la invención comprende un dominio Fc (o una porción del mismo), la molécula de diacuerpo puede reconocer inmunoespecíficamente un FcyR mediante interacciones Fc-FcyR; En otras descripciones más, cuando una molécula de la invención comprende tanto un dominio Fc (o porción del mismo) como un sitio de unión a epítipo que reconoce inmunoespecíficamente un FcyR, la molécula de diacuerpo puede reconocer un FcyR a través de uno o ambos de un dominio de unión a epítipo y el dominio Fc (o porción del mismo). Un ensayo ilustrativo para determinar los parámetros cinéticos de una molécula que comprende dominios de unión a epítopos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo) a un antígeno y/o un FcyR utilizando un aparato BIAcore comprende lo siguiente: un primer antígeno se inmoviliza en una de las cuatro celdas de flujo de la superficie de un chip sensor, preferiblemente mediante química de acoplamiento de aminas de manera que aproximadamente 5000 unidades de respuesta (UR) de dicho primer antígeno queden inmovilizadas en la superficie. Una vez preparada una superficie adecuada, las moléculas de la descripción que reconocen inmunoespecíficamente dicho primer antígeno se pasan sobre la superficie, preferiblemente mediante inyecciones de un minuto de una solución de 20 µg/mL a un caudal de 5 µL/mL. Los niveles de moléculas de la descripción unidas a la superficie en esta fase típicamente oscilan entre 400 y 700 UR. A continuación, se inyectan series de diluciones de un segundo antígeno (p. ej., FcyR) o el receptor FcyR en tampón HBS-P (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5) en la superficie a 100 µL/min. La regeneración de moléculas entre diferentes diluciones de segundo antígeno o receptor se lleva a cabo preferiblemente mediante inyecciones únicas de 5 segundos de NaHCO₃ 100 mM, pH 9,4; NaCl 3M. En el presente método se contempla cualquier mecanismo de regeneración conocido en la técnica.

Una vez que se recopila un conjunto completo de datos, las curvas de unión resultantes se ajustan globalmente utilizando algoritmos informáticos proporcionados por el fabricante del aparato de SPR, p. ej., BIAcore, Inc. (Piscataway, Nueva Jersey). Estos algoritmos calculan la K_{on} y la K_{off} , a partir de las cuales se deduce la constante de unión de equilibrio aparente, K_d como la razón de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados de cómo se obtienen las constantes de velocidad individuales en BIAevaluation Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey). El análisis de los datos generados se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Para una revisión de los diversos métodos de interpretación de los datos cinéticos generados véanse 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 descripciones preferidas, los parámetros cinéticos determinados utilizando un análisis SPR, p. ej., BIAcore, puede utilizarse como una medida predictiva de cómo funcionará una molécula de la descripción en un ensayo funcional, p. ej., ADCC. Un método ilustrativo para predecir la eficacia de una molécula de la descripción basándose en parámetros cinéticos obtenidos de un análisis SPR puede comprender lo siguiente: determinar los valores de K_{off} para la unión de una molécula de la descripción a FcyRIIIA y FcyRIIB (a través de un dominio de unión a epítipo y/o un dominio Fc (o porción del mismo)); trazar (1) K_{off} (wt)/ K_{off} (mut) para FcyRIIIA; (2) K_{off} (mut)/ K_{off} (wt) para FcyRIIB frente a los datos de ADCC. Los números superiores a uno muestran una reducción de la tasa de disociación para FcyRIIIA y un aumento de la tasa de disociación para FcyRIIB con respecto al tipo salvaje; y poseen una función ADCC mejorada.

5.5 MÉTODOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE DIACUERPO DE LA DESCRIPCIÓN

Las moléculas de diacuerpo de la presente descripción se pueden producir utilizando una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, incluida la síntesis de proteínas de novo y la expresión recombinante de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión. Las secuencias de ácido nucleico deseadas se pueden producir mediante métodos recombinantes (p. ej., mutagénesis por PCR de una variante preparada anteriormente del polinucleótido deseado) o mediante síntesis de ADN en fase sólida. Normalmente se utilizan métodos de expresión recombinantes. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una VH y/o VL de CD16A. También se describe un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica una VH y/o VL de CD32B. Debido a la degeneración del código genético, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codifica cada secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, y la presente descripción incluye todos los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión descritas en el presente documento.

5.5.1 POLINUCLEOTIDOS QUE CODIFICAN MOLÉCULAS DE LA DESCRIPCIÓN.

La presente descripción también incluye polinucleótidos que codifican las moléculas descritas en el presente documento, incluidos los polipéptidos y anticuerpos. Se pueden obtener los polinucleótidos que codifican las moléculas descritas en el presente documento y se puede determinar la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos mediante cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos de las moléculas que se identifican mediante los métodos del presente documento, la secuencia de nucleótidos se puede manipular utilizando métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York), para generar, por ejemplo, anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo generando sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

En una descripción, las bibliotecas humanas o cualquier otra biblioteca disponible en la técnica se pueden escrutar mediante mecanismos convencionales conocidos en la técnica para clonar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de la descripción.

5.5.2 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE MOLÉCULAS DE LA DESCRIPCIÓN

Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica las moléculas de la descripción (es decir, anticuerpos), el vector para la producción de las moléculas se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes para las moléculas de la descripción y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y Recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas por Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. y Ausubel et al. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de una molécula identificada mediante los métodos del presente documento se puede transferir a una célula anfitriona mediante técnicas convencionales (p. ej., electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato cálcico) y a continuación, las células transfectadas se pueden cultivar mediante técnicas convencionales para producir las moléculas de la descripción. En descripciones específicas, la expresión de las moléculas de la descripción está regulada por un promotor específico constitutivo, inducible o tisular.

Las células anfitrionas utilizadas para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento pueden ser células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de una molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamíferos, tal como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen intermedio-temprano principal del citomegalovirus humano, constituyen un sistema de expresión eficaz para las inmunoglobulinas. Foecking et al., 1998, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

Se puede utilizar una variedad de sistemas vectores de expresión en anfitriones para expresar las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento. Tales sistemas de expresión en anfitriones representan vehículos mediante los cuales se pueden producir y posteriormente purificar las secuencias codificantes de las moléculas de la descripción, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar las moléculas del presente documento *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen secuencias codificantes para las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de

células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contiene las secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus del mosaico del tabaco (TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contiene secuencias que codifican las moléculas identificadas mediante los métodos del presente documento; o sistemas de células de mamíferos (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, células linfáticas (véase el documento U.S. 5.807.715), células Per C.6 (células de la retina humana desarrolladas por Crucell) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Tales vectores incluyen, pero sin limitarse 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 ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante de *lacZ* para que se produzca una proteína de fusión; vectores pin (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden utilizarse para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de cuentas de glutatión-agarosa seguidas de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión con proteasa de trombina o factor Xa de manera que el producto del gen diana clonado pueda liberarse del radical GST.

En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autógrafo californica* (AcNPV) se utiliza como vector para expresar genes foráneos extraños. El virus crece en células *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y colocar bajo el control de un promotor de AcNPV (p. ej., el promotor de la poliedrina).

En células anfitrionas de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en donde se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico se puede insertar después en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en anfitriones infectados (p. ej., véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpos insertados. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales exógenas de control de la traducción y codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, apropiados etc. (véase Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Además, se puede elegir una cepa de células anfitrionas que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Por ejemplo, en ciertas descripciones, los polipéptidos que comprenden una molécula de diacuerpo de la descripción pueden expresarse como un producto genético único (p. ej., como una sola cadena polipeptídica, es decir, como precursor de poliproteína), que requiere escisión proteolítica mediante mecanismos celulares nativos o recombinantes para formar los polipéptidos separados de las moléculas de diacuerpo de la descripción. También se describe la modificación genética de una secuencia de ácido nucleico para codificar una molécula precursora de poliproteína que comprende los polipéptidos del diacuerpo de la descripción, que incluye secuencias codificantes capaces de dirigir la escisión postraducciona de dicho precursor de poliproteína. La escisión postraducciona del precursor de poliproteína da como resultado los polipéptidos del diacuerpo de la descripción. Se puede producir la escisión postraducciona de la molécula precursora que comprende los polipéptidos del diacuerpo de la descripción *in vivo* (es decir, dentro de la célula anfitriona mediante sistemas/mecanismos celulares nativos o recombinantes, p. ej. escisión por furina en un sitio apropiado) o se puede producir *in vitro* (p. ej. incubación de dicha cadena polipeptídica en una composición que comprende proteasas o peptidasas de actividad conocida y/o en una composición que comprende condiciones o reactivos que se sabe que fomentan la acción proteolítica deseada). La purificación y modificación de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica, de manera que el diseño del precursor de poliproteína podría incluir varias descripciones fácilmente apreciadas por un empleado experto. Para la modificación descrita de la molécula precursora se puede utilizar cualquier proteasa o peptidasa conocida en la técnica, p. ej., trombina (que reconoce la secuencia de aminoácidos LVPR⁺GS (SEQ ID NO:91)), o factor Xa (que reconoce la secuencia de aminoácidos I(E/D)GR⁺ (SEQ ID NO: 92) (Nagani et al., 1985, PNAS USA 82:7252-7255, y revisado por Jenny et al., 2003, Protein Expr. Purif. 31:1-11)), enteroquinasa (que reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK⁺ (SEQ ID NO: 93) (Collins-

Racie et al., 1995, *Biotechnol.* 13:982-987)), furina (que reconoce la secuencia de aminoácidos RXXR[^], con preferencia por RX(K/R)R[^] (SEQ ID NO:94 y SEQ ID NO:95, respectivamente) (R adicional en la posición P6 parece mejorar la escisión)), y AcTEV (que reconoce la secuencia de aminoácidos ENLYFQ[^]G (SEQ ID NO: 96) (Parks et al., 1994, *Anal. Biochem.* 216:413)) y la Proteasa C3 del Virus de la Fiebre Aftosa. Véase, por ejemplo, la sección 6.4, más arriba.

Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccionales de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, se pueden utilizar células anfitrionas eucarióticas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Tales células anfitrionas de mamífero incluyen, pero sin limitarse a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción de proteínas recombinantes a largo plazo y de alto rendimiento, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresen de manera estable un anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células anfitrionas pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (p. ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede dejar que las células modificadas crezcan durante 1 o 2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para modificar genéticamente líneas celulares que expresen los anticuerpos del presente documento. Tales líneas celulares modificadas genéticamente pueden ser particularmente útiles en el escrutinio y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con las moléculas de la descripción.

Se pueden utilizar varios sistemas de selección, que incluyen, pero sin limitarse a, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, *Cell* 11: 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980, *Cell* 22: 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Asimismo, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:357; O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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. Farmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; mayo de 1993, *TIB TECH* 11(5):155-215). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden utilizarse son descritos por Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, in *Human Genetics*, John Wiley & Sons, Nueva York.; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene* 30:147).

Los niveles de expresión de una molécula de la descripción se pueden aumentar mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula anfitriona 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, la producción del polipéptido también aumentará (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

La célula anfitriona puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, codificando el primer vector el primer polipéptido de la molécula de diacuerpo y codificando el segundo vector el segundo polipéptido de la molécula de diacuerpo. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la expresión igual de ambos polipéptidos. Alternativamente, se puede utilizar un único vector que codifique ambos polipéptidos. Las secuencias codificantes de los polipéptidos de las moléculas de la descripción pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de la descripción (es decir, diacuerpo) se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos (p. ej., análogo a los esquemas de purificación de anticuerpos basados en la selectividad de antígenos), por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por el antígeno específico (opcionalmente después de la selección con Proteína A donde la molécula de diacuerpo comprende un dominio Fc (o porción del mismo)), y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de polipéptidos, poliproteínas o diacuerpos.

5.6 MÉTODOS PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

Las moléculas de la descripción son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una función celular efectora (p. ej., ADCC) mediada por FcyR (p. ej., cáncer, enfermedad infecciosa). Como se comenta más arriba, los diacuerpos de la invención pueden exhibir una funcionalidad similar a la de un anticuerpo para provocar la función efectora, aunque la molécula de diacuerpo no comprenda un dominio Fc. Al comprender al menos un dominio de unión a epítipo que reconoce inmuno-específicamente un FcyR, la molécula de diacuerpo puede exhibir unión a FcyR y actividad análoga a las interacciones Fc-FcyR. Por ejemplo, las moléculas de la descripción pueden unirse a un antígeno de superficie celular y a un FcyR. (p. ej., FcγRIIIA) en una célula efectora inmunitaria (p. ej., célula NK), estimulando una función efectora (p. ej., ADCC, CDC, fagocitosis, opsonización, etc.) contra dicha célula.

En otras descripciones, la molécula de diacuerpo de la descripción comprende un dominio Fc (o una porción del mismo). En tales descripciones, el dominio Fc puede comprender adicionalmente al menos una modificación de aminoácido con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje (o porción del mismo) y/o puede comprender dominios de uno o más isotipos de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de la invención que comprenden dominios Fc variantes pueden exhibir fenotipos conferidos o alterados con respecto a moléculas que comprenden el dominio Fc de tipo salvaje, tal como una actividad de función efectora alterada o conferida (p. ej., analizado en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos). En dichas descripciones, las moléculas de la descripción con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una eficacia mejorada de la actividad de función efectora. En ciertas descripciones, las moléculas de diacuerpo de la descripción que comprenden un dominio Fc (o una porción del mismo) median la cascada dependiente del complemento. Las variantes del dominio Fc identificadas como alteradoras de la función efectora se divulgan en la Solicitud Internacional Núm. WO04/063351, Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0037000 y 2005/0064514, y Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 11/271.140 (Publicación Núm. US 2006-0134709 A1), presentada el 10 de noviembre de 2005, y 11/305.787 (Publicación Núm. US 2006-0177439 A1), presentada el 15 de diciembre de 2005, solicitudes concurrentes de los autores de la presente invención.

También se describen métodos y composiciones para el tratamiento, prevención o control de un cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas que comprenden uno o más sitios de unión a epítipos, y opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo) modificados genéticamente según la descripción del presente documento, cuyas moléculas se unen adicionalmente a un antígeno canceroso. Las moléculas de la descripción son particularmente útiles para la prevención, inhibición, reducción del crecimiento o regresión de tumores primarios, metástasis de células cancerosas y enfermedades infecciosas. Aunque no se desea limitarse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de la descripción median la función efectora que da como resultado la eliminación del tumor, la reducción del tumor o una combinación de las mismas. En descripciones alternativas, los diacuerpos de la descripción median la actividad terapéutica mediante el entrecruzamiento de antígenos y/o receptores de la superficie celular y una apoptosis mejorada o señalización reguladora del crecimiento negativo.

Aunque no se desea limitarse a un mecanismo de acción particular, las moléculas de diacuerpo de la descripción exhiben una eficacia terapéutica mejorada con respecto a los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, en parte, debido a la capacidad del diacuerpo para unirse inmuno-específicamente a una célula diana que expresa un antígeno particular (p. ej., FcyR) a niveles reducidos, por ejemplo, en virtud de la capacidad del diacuerpo de permanecer más tiempo en la célula diana debido a una avidéz mejorada de la interacción diacuerpo-epítipo.

Los diacuerpos de la descripción con mayor afinidad y avidéz por los antígenos (p. ej., FcyR) son particularmente útiles para el tratamiento, prevención o control de un cáncer, u otra enfermedad o trastorno, en un sujeto, en donde los FcyR se expresan a niveles bajos en las poblaciones de células diana. Como se emplea en el presente documento, la expresión de FcyR en células se define en términos de la densidad de tales moléculas por célula medida utilizando métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de la descripción que comprenden sitios de unión a epítipos múltiples y, opcionalmente, FcyR (o porción del mismo) preferiblemente también tienen una avidéz y afinidad y/o función efectora conferidas o aumentadas en células que expresan un antígeno diana, p. ej., un antígeno canceroso, a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 moléculas/célula o menos, a una densidad de 5.000 moléculas/célula o menos, o a una densidad de 1.000 moléculas/célula o menos. Las moléculas de la descripción tienen utilidad particular en el tratamiento, prevención o control de una enfermedad o trastorno, tal como cáncer, en una subpoblación, en donde el antígeno diana se expresa a niveles bajos en la población de células diana.

Las moléculas de la descripción también se pueden utilizar ventajosamente combinadas con otros agentes terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento o prevención de enfermedades, tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas. En una descripción específica, las moléculas de la descripción se pueden utilizar combinadas con anticuerpos monoclonales o quiméricos, linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, p. ej., IL-2, IL-3 e IL-7), que, por ejemplo, sirven para aumentar el número o la actividad de las células efectoras que interactúan con las moléculas y aumentar la respuesta inmunitaria. Las moléculas de la descripción también se pueden utilizar ventajosamente combinadas con uno o más fármacos

utilizados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo, agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales, p. ej., como se detalla en la Sección 5.7.

5.6.1 CÁNCERES

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

La eficacia de la terapia convencional con anticuerpos monoclonales depende del polimorfismo de FcγR del sujeto (Carton et al., 2002 Blood, 99: 754-8; Weng et al., 2003 J Clin Oncol. 21(21):3940-7). Estos receptores se expresan en la superficie de las células efectoras y median la ADCC. Los alelos de alta afinidad, de los receptores activadores de baja afinidad, mejoran la capacidad de las células efectoras para mediar la ADCC. En contraste con la dependencia de las interacciones Fc-FcγR para efectuar la función efectora, los métodos del presente documento abarcan la modificación genética de moléculas para que reconozcan inmunoespecíficamente los receptores activadores de baja afinidad, lo que permite diseñar las moléculas para un polimorfismo específico. De forma alternativa o adicional, la molécula de la descripción puede modificarse genéticamente para que comprenda un dominio Fc variante que exhiba mayor afinidad por FcγR (con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje) en células efectoras. Las moléculas modificadas genéticamente de la descripción proporcionan mejores reactivos de inmunoterapia para los pacientes independientemente de su polimorfismo de FcγR.

Las moléculas de diacuerpo modificadas genéticamente según la descripción del presente documento se someten a prueba mediante ADCC utilizando una línea celular cultivada o células PMBC obtenidas del paciente para determinar la capacidad de las mutaciones de Fc para mejorar la ADCC. La ADCC convencional se realiza utilizando los métodos divulgados en el presente documento. Los linfocitos se recogen de sangre periférica utilizando un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células diana, es decir, líneas celulares cultivadas o células obtenidas de pacientes, se cargan con europio (PerkinElmer) y se incuban con efectores durante 4 horas a 37°C. El europio liberado se detecta mediante un lector de placas fluorescentes (Wallace). Los datos de ADCC resultantes indican la eficacia de las moléculas de la descripción para desencadenar la citotoxicidad mediada por células NK y establecer qué moléculas se pueden probar tanto con muestras de pacientes como con monocitos elutriados. A continuación, las moléculas de diacuerpo que muestran el mayor potencial para provocar actividad ADCC se prueban en un ensayo de ADCC utilizando PBMC de pacientes. Como células efectoras se utilizan PBMC de donantes sanos.

También se describen métodos para prevenir o tratar el cáncer caracterizado por un antígeno canceroso mediante la modificación genética de la molécula de diacuerpo para reconocer inmunoespecíficamente dicho antígeno canceroso de manera que la molécula de diacuerpo sea en sí misma citotóxica (p. ej., a través del entrecruzamiento de receptores de superficie que conducen a una mayor apoptosis o regulación por disminución de señales proliferativas) y/o comprende un dominio Fc, y/o media una o más funciones efectoras (p. ej., ADCC, fagocitosis). Los diacuerpos que han sido modificados genéticamente según la descripción del presente documento son útiles para la prevención o tratamiento del cáncer, ya que tienen una actividad citotóxica (p. ej., destrucción mejorada de células tumorales y/o actividad mejorada, por ejemplo, actividad ADCC o actividad CDC).

Los cánceres asociados con un antígeno canceroso pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un diacuerpo que se une a un antígeno canceroso y es citotóxico, y/o ha sido modificado genéticamente según los métodos del presente documento para exhibir una función efectora. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los cánceres asociados con los siguientes antígenos cancerosos pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y composiciones del presente documento: antígeno de pancarcinoma KS 1/4 (Pérez y Walker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415), antígeno del carcinoma de ovario (CA125) (Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):48-475), fosfato ácido prostático (Tailor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1):4928), antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230), antígeno p97 asociado a melanoma (Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-44), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), antígeno de 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)), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294), antígeno de mucina epitelial polimórfica, antígeno del glóbulo de grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumores Colorrectales tales como: CEA, TAG-72 (Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno-38.13 de linfoma de Burkitt, CD19 (Ghetie et al., 1994, Blood 83:1329-1336), antígeno de linfoma B humano-CD20 (Reff et al., 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos del melanoma como gangliósido GD2 (Saleh et al., 1993, J. Immunol., 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53:5244-5250), antígeno

de superficie celular tipo trasplante específico de tumor (TSTA), tales como antígenos tumorales inducidos viralmente, incluidos virus tumorales de ADN con antígeno T y antígenos de envoltura de virus tumorales de ARN, antígeno alfa-fetoproteína oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal tumoral de vejiga (Hellstrom et al., 1985, Cancer Res. 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno del cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), antígeno de linfocitos humanos maligno APO-1 (Bernhard et al., 1989, Science 245:301-304), 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, I(Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 que se encuentran en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 y D156-22 que se encuentran en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 que se encuentra en adenocarcinoma de colon, F3 que se encuentra en adenocarcinoma de pulmón, AH6 que se encuentra en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y que se encuentra en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF que se encuentra en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) que se encuentra en cáncer de páncreas, FC10.2 que se encuentra en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) que se encuentra en adenocarcinoma, NS-10 que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49, receptor de EGF, (grupo sanguíneo ALe^b/Le^y) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, 19.9 que se encuentra en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ que se encuentra en células mieloides, R₂₄ que se encuentra en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1:22:25:8 que se encuentran en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 que se encuentran en embriones en fase de 4 a 8 células. En otra descripción, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma cutáneo de células T. (véase Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

Los cánceres y trastornos relacionados que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y composiciones del presente documento incluyen, pero sin limitarse a, los siguientes: leucemias que incluyen, pero sin limitarse a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como, pero sin limitarse a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero sin limitarse a, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma solitario y plasmocitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadenas pesadas; sarcomas de hueso y tejido conectivo tales como, pero sin limitarse a, sarcoma de hueso, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales que incluyen, pero sin limitarse a, glioma, astrocitoma, glioma de tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, incluyendo, pero sin limitarse a, feocromocitoma y carcinoma de la corteza suprarrenal; cáncer de tiroides tal como, pero sin limitarse a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas, incluyendo, pero sin limitarse a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres de pituitaria que incluyen, pero sin limitarse a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insipidus; cánceres oculares que incluyen, pero sin limitarse a, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales, incluidos, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de endometrio y sarcoma uterino; cánceres de ovario que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma epitelial de ovario, tumor límite, tumor de células germinales y tumor estromal; cánceres de esófago que incluyen, pero sin limitarse a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago que incluyen, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, fungoso (polipoide), ulcerante, de extensión superficial, de extensión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres de recto; cánceres de hígado, incluidos, pero sin limitarse a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar, incluidos, pero sin limitarse a, adenocarcinoma; colangiocarcinomas que incluyen, pero sin limitarse a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón que incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares que incluyen, pero sin limitarse 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 sin limitarse a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, y rabdomiosarcoma;

cánceres de pene; cánceres orales que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales que incluyen, pero sin limitarse a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe que incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de células escamosas y verrugosos; cánceres de piel que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón que incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o útero); tumor de Wilms; cánceres de vejiga que incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma y carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos, véanse Fishman et al., 1985, Medicine, 2.^a edición, J.B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

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

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

En una descripción específica, una molécula de la descripción (p. ej., un diacuerpo que comprende dominios de unión a epítomos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo)) destruye células o inhibe o reduce el crecimiento de células cancerosas al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% mejor que la molécula parental.

5.6.2 ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

En algunas descripciones, las moléculas de la descripción comprenden un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante (o porción del mismo), modificado genéticamente según los métodos del presente documento, cuyo dominio Fc exhibe mayor afinidad por FcγRIIB y menor afinidad por FcγRIIA y/o FcγRIIA con respecto a un dominio Fc de tipo salvaje. Las moléculas de la descripción con tales características de unión son útiles para regular la respuesta inmunitaria, p. ej., inhibiendo la respuesta inmunitaria con respecto a enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias. Aunque no se pretende limitarse a ningún mecanismo de acción, las moléculas de la descripción con afinidad por FcγRIIB y/o que comprenden un dominio Fc con mayor afinidad por FcγRIIB y menor por FcγRIIA y/o FcγRIIA pueden conducir a una amortiguación de la respuesta activadora a FcγR y a la inhibición de la capacidad de respuesta celular, y por lo tanto tienen eficacia terapéutica para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmunitario.

También se describen métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio en un sujeto que comprenden adicionalmente administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antiinflamatorios. También se describen métodos para prevenir, tratar o controlar uno o más síntomas asociados con una enfermedad inmunitaria que comprenden adicionalmente

administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes inmunomoduladores. La sección 5.7 proporciona ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios y agentes inmunomoduladores.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse mediante la administración de las moléculas de la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitarse a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Como se describe en el presente documento en la Sección 2.2.2, algunos trastornos autoinmunitarios están asociados con una afección inflamatoria. Por tanto, existe una superposición entre lo que se considera un trastorno autoinmunitario y un trastorno inflamatorio. Por lo tanto, algunos trastornos autoinmunitarios también pueden caracterizarse como trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden prevenirse, tratarse o controlarse según los métodos del presente documento incluyen, pero sin limitarse a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.

Las moléculas de la descripción que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una mayor afinidad por FcγRIIB y una menor afinidad por FcγRIIIA también se pueden utilizar para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una descripción específica, una molécula de la descripción reduce la inflamación en un animal en al menos 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 45%, al menos 40%, al menos 35%, al menos 30%, al menos 25%, al menos 20%, o al menos 10% con respecto a la inflamación en un animal al que no se le administra dicha molécula.

Las moléculas de la descripción que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para FcγRIIB y/o un dominio Fc variante con una mayor afinidad por FcγRIIB y una menor afinidad por FcγRIIIA también se pueden utilizar para prevenir el rechazo de trasplantes.

5.6.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprenden administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la descripción que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para un agente infeccioso asociado con dicha enfermedad infecciosa. En ciertas descripciones, las moléculas de la descripción son tóxicas para el agente infeccioso, mejoran la respuesta inmunitaria contra dicho agente o mejoran la función efectora contra dicho agente, con respecto a la respuesta inmunitaria en ausencia de dicha molécula. Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse o prevenirse mediante las moléculas de la descripción son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero sin limitarse a, virus, bacterias, hongos, protozos y virus.

Las enfermedades virales que pueden tratarse o prevenirse utilizando las moléculas de la descripción junto con los métodos del presente documento incluyen, pero sin limitarse a, aquellas causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-I), herpes simple tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

Las enfermedades bacterianas que pueden tratarse o prevenirse utilizando las moléculas de la descripción junto con los métodos del presente documento, que son causadas por bacterias incluyen, pero sin limitarse a, micobacterias rickettsia, micoplasma, neisseria, S. pneumoniae, Borrelia burgdorferi (enfermedad de Lyme), Bacillus anthracis

(ántrax), tétanos, estreptococos, estafilococos, micobacterias, tétanos, pertussis, cólera, peste, difteria, clamidia, *S. aureus* y *legionella*.

Las enfermedades protozoarias que pueden tratarse o prevenirse utilizando las moléculas de la descripción junto con los métodos del presente documento, que son causadas por protozoos incluyen, pero sin limitarse a, leishmania, kokzidioa, tripanosoma o malaria.

Las enfermedades parasitarias que pueden tratarse o prevenirse utilizando las moléculas de la descripción junto con los métodos del presente documento, que son causadas por parásitos incluyen, pero sin limitarse a, clamidia y rickettsia.

Según una descripción, las moléculas de la descripción que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para un agente infeccioso exhiben una función efectora de anticuerpo frente a dicho agente, p. ej., una proteína patogénica. Los ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero sin limitarse a, bacterias (p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, y *Pseudomonas aeruginosa*), un patógeno (p. ej., papovavirus linfotrópico B (LPV); Bordetella pertussis; virus de la Enfermedad de Borna (BDV); Coronavirus bovino; Virus de la coriomeningitis; Virus del dengue; un virus, E. coli; Ébola; Ecovirus 1; Ecovirus-11 (EV); Endotoxina (LPS); Bacterias entéricas; Virus entérico huérfano; Enterovirus; Virus de la leucemia felina; Virus de la fiebre aftosa; Virus de la leucemia del simio gibón (GALV); Bacterias Gram-negativas; *Helicobacter pylori*; Virus de la hepatitis B (VHB); Virus del herpes simple; VIH-1; Citomegalovirus humano; Coronavirus humano; Gripe A, B y C; Legionela; *Leishmania mexicana*; *Listeria monocytogenes*; Virus del sarampión; Meningococo; Morbilivirus; Virus de la hepatitis del ratón; Virus de la leucemia murina; Virus del herpes gamma murino; Retrovirus murino; Virus de la hepatitis del ratón coronavirus murino; *Mycobacterium avium-M*; *Neisseria gonorrhoeae*; Virus de la enfermedad de Newcastle; Parvovirus B19; *Plasmodium falciparum*; Virus de la Viruela; *Pseudomonas*; Rotavirus; *Salmonella typhimurium*; Shigella; Estreptococos; virus linfotrópico de células T 1; Virus vaccinia).

5.6.4 DESTOXIFICACIÓN

También se describen métodos de destoxificación en un sujeto expuesto a una toxina (p. ej., una molécula de fármaco tóxico) que comprende administrar una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una o más moléculas de la descripción que comprenden al menos un dominio de unión a epítipo específico para la molécula de fármaco tóxico. En ciertas descripciones, la unión de una molécula de la descripción a la toxina reduce o elimina el efecto fisiológico adverso de dicha toxina. En otras descripciones más, la unión de un diacuerpo de la descripción a la toxina aumenta o mejora la eliminación, degradación o neutralización de la toxina con respecto a la eliminación, degradación o neutralización en ausencia de dicho diacuerpo. La inmunotoxicoterapia según los métodos del presente documento se puede utilizar para tratar sobredosis o exposición a fármacos que incluyen, pero sin limitarse a, digoxina, PCP, cocaína, colchicina y antidepresivos tricíclicos.

5.7 TERAPIA COMBINADA

También se describe la administración de las moléculas de la descripción combinadas con otras terapias conocidas por los expertos en la técnica para el tratamiento o prevención de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas o intoxicaciones, incluidas, pero sin limitarse a, quimioterapias convencionales y experimentales actuales, terapias hormonales, terapias biológicas, inmunoterapias, radioterapias o cirugía. En algunas descripciones, las moléculas de la descripción se pueden administrar combinadas con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes, anticuerpos terapéuticos u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas o intoxicación.

En ciertas descripciones, una o más moléculas de la descripción se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer. El término "concurrentemente" no se limita a la administración de agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien significa que una molécula de la descripción y el otro agente se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera que la molécula de la descripción pueda actuar junto con el otro agente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada agente profiláctico o terapéutico (p. ej., quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o terapia biológica) pueden administrarse al mismo tiempo o de forma secuencial en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada agente terapéutico puede administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas descripciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, con aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, con aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, con aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, con aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, con aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, con aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, con

aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, con aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, con aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, con no más de 24 horas de diferencia o con no más de 48 horas de diferencia. En descripciones preferidas, se administran dos o más componentes dentro de la misma visita al paciente.

- 5 En otras descripciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran con aproximadamente 2 a 4 días de diferencia, con aproximadamente 4 a 6 días de diferencia, con aproximadamente 1 semana de diferencia, con aproximadamente 1 a 2 semanas de diferencia o con más de 2 semanas de diferencia. En descripciones preferidas, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran en un período de tiempo en donde ambos agentes todavía están activos. Un experto en la técnica podría determinar tal período de tiempo determinando la semivida de los
- 10 agentes administrados.

- En ciertas descripciones, los agentes profilácticos o terapéuticos de la descripción se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente durante un período de tiempo, seguida de la administración de un segundo agente y/o un tercer agente durante un período de tiempo y la repetición de esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o mejorar la eficacia del tratamiento.
- 15

- En ciertas descripciones, los agentes profilácticos o terapéuticos se administran 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 infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos, y más típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.
- 20

- En otras descripciones más, los agentes terapéuticos y profilácticos de la descripción se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea mediante infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Típicamente los agentes terapéuticos, en particular los agentes citotóxicos, se utilizan a dosis más bajas. Tales regímenes de dosificación abarcan la administración diaria crónica de dosis relativamente bajas durante períodos de tiempo prolongados. En descripciones preferidas, el uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios tóxicos y eliminar los períodos de descanso. En ciertas descripciones, los agentes terapéuticos y profilácticos se suministran mediante infusión continua o mediante dosis baja crónica que varía de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 2 semanas, a aproximadamente 3 semanas, a aproximadamente 1 mes, a aproximadamente 2 meses, a aproximadamente 3 meses, a aproximadamente 4 meses, a aproximadamente 5 meses, a aproximadamente 6 meses. El oncólogo experto puede optimizar la programación de tales regímenes de dosificación.
- 25
- 30
- 35

- En otras descripciones, los cursos de tratamiento se administran simultáneamente a un mamífero, es decir, las dosis individuales de los agentes terapéuticos se administran por separado, pero dentro de un intervalo de tiempo tal que las moléculas de la descripción puedan trabajar junto con el otro agente o agentes. Por ejemplo, un componente puede administrarse una vez por semana combinado con los otros componentes que pueden administrarse una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En otras palabras, los regímenes de dosificación de los agentes terapéuticos se llevan a cabo concurrentemente incluso si los agentes terapéuticos no se administran simultáneamente o dentro de la misma visita al paciente.
- 40

- Cuando se utilizan combinadas con otros agentes profilácticos y/o terapéuticos, las moléculas de la descripción y el agente profiláctico y/o terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferiblemente, sinérgica. En una descripción, una molécula de la descripción se administra concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica. En otra descripción, una molécula de la descripción se administra concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos diferentes en composiciones farmacéuticas separadas. En otra descripción más, una molécula de la descripción se administra antes o después de la administración de otro agente profiláctico o terapéutico. También se describe la administración de una molécula de la descripción combinada con otros agentes profilácticos o terapéuticos por la misma o diferentes vías de administración, p. ej., oral y parenteral. En ciertas descripciones, cuando una molécula de la descripción se administra concurrentemente con otro agente profiláctico o terapéutico que potencialmente produce efectos secundarios adversos que incluyen, pero sin limitarse a, toxicidad, el agente profiláctico o terapéutico se puede administrar ventajosamente a una dosis que cae por debajo del umbral en el que se provoca el efecto secundario adverso.
- 45
- 50

- Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Adicionalmente, la dosificación y la frecuencia variarán típicamente según factores específicos de cada paciente, dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, la gravedad y el tipo de cáncer, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia médica antecedente del paciente. Un experto en la técnica puede seleccionar
- 55

regímenes adecuados considerando tales factores y siguiendo, por ejemplo, las dosificaciones referidas en la bibliografía y recomendadas en Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002).

5.7.1 AGENTES ANTICÁNCEROSOS

- También se describe la administración de una o más moléculas de la descripción con uno o más agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento y/o prevención del cáncer. En una descripción, los inhibidores de la angiogénesis se pueden administrar combinados con las moléculas de la descripción. Los inhibidores de la angiogénesis que se pueden utilizar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a: angiostatina (fragmento de plasminógeno); antitrombina III antiangiogénica; Angiozima; ABT-627; Bay 12-9566; Benefin; Bevacizumab; BMS-275291; inhibidor derivado del cartílago (CDI); CAI; fragmento de complemento CD59; CEP-7055; Col 3; Combretastatina A-4; Endostatina (fragmento de colágeno XVIII); Fragmento de fibronectina; Gro-beta; Halofuginona; Heparinasas; Fragmento 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 (fragmento de plasminógeno); Marimastato; Inhibidores de metaloproteinasas (TIMP); 2-Metoxiestradiol; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; Neovastato; NM-3; Panzem; PI-88; Inhibidor de la ribonucleasa placentaria; Inhibidor del activador del plasminógeno; Factor plaquetario 4 (PF4); Prinomastato; Fragmento de prolactina de 16 kDa; Proteína relacionada con la proliferina (PRP); PTK 787/ZK 222594; Retinoides; Solimastato; Escualamina; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; Tetrahydrocortisol-S; tetratiomolibdato; talidomida; Trombospondina-1 (TSP-1); TNP-470; Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); Vasculostatina; Vasostatina (fragmento de calreticulina); ZD6126; ZD 6474; inhibidores de farnesil transferasa (FTI); y bisfosfonatos.
- Los agentes anticancerosos que se pueden utilizar combinados con las moléculas descritas en el presente documento en las diversas descripciones, incluidas composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits, incluyen, pero sin limitarse a: acivicina; aclarrubicina; hidroclicloruro de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimidato; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastato; benzodepa; bicalutamida; hidroclicloruro de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimero; carboplatino; carmustina; hidroclicloruro de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; ciolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidroclicloruro de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; hidroclicloruro de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidroclicloruro de eflomitina; elsamitruccina; enloplatino; enpromate; epipropidina; hidroclicloruro de epirubicina; erbulozol; hidroclicloruro de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; hidroclicloruro de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; hidroclicloruro de gemcitabina; hidroxiurea; hidroclicloruro de idarrubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluida interleucina II recombinante o rIL2); interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatino; hidroclicloruro de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; hidroclicloruro de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; hidroclicloruro de losoxantrona; masoprocil; maitansina; hidroclicloruro de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; hidroclicloruro de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfán; hidroclicloruro de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; hidroclicloruro de procarbazona; puomicina; hidroclicloruro de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; hidroclicloruro de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato de sodio; esparfomicina; hidroclicloruro de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; hidroclicloruro de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; hidroclicloruro de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; hidroclicloruro de zorrubicina. Otros fármacos anticancerosos incluyen, pero sin limitarse a: 20-epi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética antidorsalizante-1; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastato; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breffato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína

quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; cloro; 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 criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatamo; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreto de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafrina; nitrato de galio; galocitabina; ganirélix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastato; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplac; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipófilos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafrina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastato; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor del MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble hebra emparejado erróneamente; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitoxina de factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en supresores de tumores múltiples 1; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelinea; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartogastim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nítrico; nitrulino; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocinas orales; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentrozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; hidrocloreto de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteosoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; producto conjugado de polioxiétileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; retileptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; roquinona B1; ruboxilo; santopin; SarCNU; sarcófitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos efectores; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiestatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metioduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; teniposido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdines; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalámero. Los fármacos anticancerosos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que se pueden utilizar en los métodos del presente documento incluyen, pero sin limitarse a, ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado inmunosupresor para la prevención del rechazo agudo de aloinjertos renales; PANOREX™ que es un anticuerpo IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-1A murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2, que es un anticuerpo IgG antiidiotipo murino (epítipo GD3) (ImClone System); IMC-C225 que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ que es un anticuerpo humanizado anti-integrina- $\alpha v \beta 3$ (Applied Molecular

Evolution/MedImmune); Smart M195, que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); LINFOCIDE™ que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); ICM3 es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131 es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Lab); 5G1.1 es un anticuerpo anti-factor 5 del complemento (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 es un anticuerpo anti-TNF- α humanizado (CAT/BASF); CDP870 es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571 es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02 es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); y CAT-152 es un anticuerpo anti-TGF- β 2 humano (Cambridge Ab Tech). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden utilizarse se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Anticuerpos terapéuticos anticancerosos

Compañía	Producto	Enfermedad	Diana
Abgenix	ABX-EGF	Cáncer	receptor de EGF
AltaRex	OvaRex	cáncer de ovario	antígeno tumoral CA125
	BravaRex	cánceres metastásicos	antígeno tumoral MUC1
Antisoma	Theragyn (pemtumomabytrium-90)	cáncer de ovario	antígeno PEM
	Therex	cáncer de mama	antígeno PEM
Boehringer Ingelheim	Blvatuzumab	cáncer de cabeza y cuello	CD44
Centocor/J&J	Panorex	Cáncer colorrectal	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	IM agudo	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	Accidente cerebrovascular isquémico	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAB, 105AD7	vacuna contra el cáncer colorrectal	gp72
Crucel	Anti-EpCAM	cáncer	Ep-CAM
Cytoclonal	MAB, cáncer de pulmón	cáncer de pulmón de células no pequeñas	NA
Genentech	Herceptina	cáncer de mama metastásico	HER-2
	Herceptina	cáncer de mama en fase temprana	HER-2
	Rituxán	LNH folicular o de bajo grado en recaída/refractario	CD20

Compañía	Producto	Enfermedad	Diana
	Rituxán	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, metastásico	VEGF
	MAB-VEGF	Cáncer colorrectal metastásico	VEGF
	AMD Fab	degeneración macular relacionada con la edad	CD18
	E-26 (2º gen. IgE)	asma alérgica y rinitis	IgE
IDEC	Zevalin (Rituxan + itrio-90)	LNH de células B de bajo grado, folicular, recidivante o refractario, positivo para CD20 y LNH refractario a Rituximab	CD20
Im Clone	Cetuximab + irinotecán	carcinoma colorrectal refractario	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino y radiación	cáncer de cabeza y cuello recién diagnosticado o recurrente.	receptor de EGF
	Cetuximab + gemcitabina	carcinoma de páncreas metastásico recién diagnosticado	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino + 5FU o Taxol	cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico.	receptor de EGF
	Cetuximab + carboplatino + paclitaxel	carcinoma de pulmón de células no pequeñas recién diagnosticado.	receptor de EGF
	Cetuximab + cisplatino	cáncer de cabeza y cuello (enfermedad local-regional extensa incurable y metástasis a distancia)	receptor de EGF
	Cetuximab + radiación	carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado.	receptor de EGF
	BEC2 + Bacilo Calmette Guérin	carcinoma de pulmón de células pequeñas	imita el gangliósido GD3
	BEC2 + Bacilo Calmette Guérin	melanoma	imita el gangliósido GD3
	IMC-1C11	cáncer colorrectal con metástasis hepática.	Receptor de VEGF
InmonoGen	nuC242-DM1	Cáncer colorrectal, gástrico y pancreático	nuC242
InmunoMedics	Linfocida	Linfoma no Hodgkin	CD22
	Linfocida Y-90	Linfoma no Hodgkin	CD22

Compañía	Producto	Enfermedad	Diana
	CEA-Cide	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Cide Y-90	tumores sólidos metastásicos	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer colorrectal (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	Cáncer de mama (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	cáncer de pulmón (radioimagen)	CEA
	CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m)	tumores intraoperatorios (radioimagen)	CEA
	LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m)	infección de tejidos blandos (radioimagen)	CEA
	LymphoScan (marcado con Tc-99m)	linfomas (radioimagen)	CD22
	AFP-Scan (marcado con Tc-99m)	cánceres de hígado de células gem. 7 (radioimagen)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ itrio-90)	cáncer de cabeza y cuello	NA
	HumaSPECT	imagen colorrectal	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	Próstata y otros cánceres	CTLA-4
	MDX-210 (expresión en exceso de her-2)	Cancer de próstata	HER-2
	MDX-210/MAK	Cáncer	HER-2
MedImmune	Vitaxina	Cáncer	$\alpha\beta_3$
Merck KGaA	MAb 425	Varios cánceres	receptor de EGF
	IS-IL-2	Varios cánceres	Ep-CAM
Millenium	Campath (alemtuzumab)	leucemia linfocítica crónica	CD52
NeoRx	CD20-estreptavidina (+ biotina- itrio 90)	Linfoma no Hodgkin	CD20
	Avidicina (albúmina + NRLU13)	cáncer metastásico	NA
Peregrine	Oncolym (+ yodo-131)	Linfoma no Hodgkin	HLA-DR beta 10

Compañía	Producto	Enfermedad	Diana
	Cotara (+ yodo-131)	glioma maligno irresecable	Proteínas asociadas a ADN
Pharmacia Corporation	C215 (+ enterotoxina estafilocócica)	cáncer de páncreas	NA
	MAB, cáncer de pulmón/riñón	cáncer de pulmón y riñón	NA
	nacolumab tafenatox (C242 + enterotoxina estafilocócica)	cáncer de colon y páncreas	NA
Protein Design Labs	Nuvión	Neoplasias malignas de células T	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	Antígeno HLA-DR
Titan	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas.	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Trilex	CEAVac	cáncer colorrectal avanzado	CEA
	TriGem	Melanoma metastásico y cáncer de pulmón de células pequeñas.	gangliósido GD2
	TriAb	cáncer de mama metastásico	MUC-1
Viventia Biotech	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
Xoma	Rituxán	LNH folicular o de bajo grado en recaída/refractario	CD20
	Rituxán	NHL de grado intermedio y alto	CD20
	ING-1	adenocarcinoma	Ep-CAM

5.7.2 AGENTES INMUNOMODULADORES Y AGENTES ANTIINFLAMATORIOS

También se describen métodos de tratamiento para enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que comprenden la administración de las moléculas de la descripción junto con otros agentes de tratamiento. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero sin limitarse a, metotrexato, ENBREL, REMICADE™, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A y antibióticos macrólidos (p. ej., FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina,

brequinar, malononitriloamindas (p. ej., leflunamida), moduladores del receptor de células T y moduladores del receptor de citocinas.

Los agentes antiinflamatorios han tenido éxito en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios y en la actualidad son un tratamiento común y normalizado para tales trastornos. En los métodos del presente documento se puede utilizar cualquier agente antiinflamatorio bien conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, beta-agonistas, agentes anticolingéricos y metilxantinas. Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitarse a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSÍN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (p. ej., COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero sin limitarse a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), cortisona, hidrocortisona, prednisona (DELTASONE™), prednisolona, triamcinolona, azulfidina y eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se pueden utilizar para el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios junto con las moléculas de la descripción se presenta en la Tabla 9, y un ejemplo no limitante de los anticuerpos que se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de trastornos autoinmunitarios se presenta en la Tabla 10.

Tabla 9: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	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	LES
5G1.1	Complemento (C5)	Humanizado	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefritis
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Derivación cardiopulmonar
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Infarto de miocardio
5G1.1-SC	Complemento (C5)	Humanizado	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastia
ABX-CBL	CBL	Humano		Abgenix Inc.	GvHD
ABX-CBL	CD 147	Murino	IgG	Abgenix Inc.	Rechazo de aloinjerto
ABX-IL8	IL-8	Humano	IgG2	Abgenix Inc.	Psoriasis
Antegren	VLA-4	Humanizado	IgG	Athena/Elan	Esclerosis múltiple
Anti-CD11a	CD11a	Humanizado	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriasis
Anti-CD18	CD18	Humanizado	Fab'2	Genetech Inc	Infarto de miocardio
Anti-LFA1	CD18	Murino	Fab'2	Pasteur-Mérieux/	Rechazo de aloinjerto

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
				Immunotech	
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	Rechazo de aloinjerto
Antova	CD40L	Humanizado	IgG	Biogen	LES
BTI-322	CD2	Rata	IgG	Medimmune Inc.	GvHD, Psoriasis
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Cell Tech	Enfermedad de Crohn
CDP571	TNF-alfa	Humanizado	IgG4	Cell Tech	Artritis reumatoide
CDP850	Selectina E	Humanizado		Cell Tech	Psoriasis
Corsevin M	Fact VII	Quimérico		Centocor	Anticoagulante
D2E7	TNF-alfa	Humano		CAT/BASF	Artritis reumatoide
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado		ICOS Pharm Inc.	Esclerosis múltiple
Hu23F2G	CD11/18	Humanizado	IgG	ICOS Pharm Inc.	Accidente cerebrovascular
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc.	Choque tóxico
ICM3	ICAM-3	Humanizado		ICOS Pharm Inc.	Psoriasis
IDEC-114	CD80	Primatizado		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriasis
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	LES
IDEC-131	CD40L	Humanizado		IDEC Pharm/Eisai	Esclerosis múltiple
IDEC-151	CD4	Primatizado	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Artritis reumatoide
IDEC-152	CD23	Primatizado		IDEC Pharm	Asma/Alergia
Infliximab	TNF-alfa	quimérico	IgG1	Centocor	Artritis reumatoide
Infliximab	TNF-alfa	quimérico	IgG1	Centocor	Enfermedad de Crohn
LDP-01	Integrina beta2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (Leuko Site Inc.)	Accidente cerebrovascular
LDP-01	Integrina beta2	Humanizado	IgG	Millennium Inc (Leuko Site Inc.)	Rechazo de aloinjerto

Nombre del anticuerpo	Antígeno diana	Tipo de producto	Isotipo	Patrocinadores	Indicación
LDP-02	alfa4beta7	Humanizado		Millennium Inc (Leuko Site Inc.)	Colitis ulcerosa
MAK-195F	TNF alfa	Murino	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Choque tóxico
MDX-33	CD64 (FcR)	Humano		Medarex/Centeon	Trastornos hematológicos autoinmunitarios
MDX-CD4	CD4	Humano	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Artritis reumatoide
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc.	Psoriasis
MEDI-507	CD2	Humanizado		Medimmune Inc.	GvHD
OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Orto Biotech	Rechazo de aloinjerto
OrthoClone OKT4A	CD4	Humanizado	IgG	Orto Biotech	Enfermedad autoinmunitaria
Ortoclone/anti-CD3 OKT3	CD3	Murino	mIgG2a	Orto Biotech	Rechazo de aloinjerto
RepPro/Abciximab	gpIIb/IIIa	Quimérico	Fab	Centocor/Lilly	Complicaciones de la angioplastia coronaria
ruMab-E25	IgE	Humanizado	IgG1	Genentech/Novartis/Tanox Biosystems	Asma/Alergia
SB-240563	IL5	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SB-240683	IL-4	Humanizado		GlaxoSmithKline	Asma/Alergia
SCH55700	IL-5	Humanizado		Celltech /Schering	Asma/Alergia
Simulect	CD25	Quimérico	IgG1	Novartis Pharm	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Enfermedad autoinmunitaria
SMART a-CD3	CD3	Humanizado		Protein Design Lab	Rechazo de aloinjerto
SMART a-CD3	CD3	Humanizado	IgG	Protein Design Lab	Psoriasis
Zenapax	CD25	Humanizado	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Rechazo de aloinjerto

Tabla 10: Anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
ABX-RB2		anticuerpo contra el antígeno CBL en células T, células B y células NK anticuerpo completamente humano del xenomouse
5c8 (anticuerpo Anti-antígeno CD-40)	Los ensayos de fase II se detuvieron en octubre de 99 para examinar los "eventos adversos"	CD-40
IDEC 131	Lupus eritematoso sistémico (LES)	anti-CD40 humanizado
IDEC 151	artritis reumatoide	primatizado; anti-CD4
IDEC 152	Asma	primatizado; anti-CD23
IDEC 114	Psoriasis	anti-CD80 primatizado
MEDI-507	artritis reumatoide; esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, Psoriasis	anti-CD2
LDP-02 (mAb anti-b7)	enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa	Receptor de integrina $\alpha 4\beta 7$ en los glóbulos blancos (leucocitos)
Anticuerpo SMART antiinterferón gamma	trastornos autoinmunitarios	Anti-Interferón Gamma
Verteportina	artritis reumatoide	
MDX-33	trastornos sanguíneos causados por reacciones autoinmunitarias Trombocitopenia Purpúrea Idiopática (PTI) anemia hemolítica autoinmunitaria	anticuerpo monoclonal contra los receptores FcRI
MDX-CD4	tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias	Anticuerpo monoclonal contra la molécula del receptor CD4.
VX-497	trastornos autoinmunitarios esclerosis múltiple artritis reumatoide enfermedad inflamatoria intestinal lupus psoriasis	inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa (enzima necesaria para producir ARN y ADN nuevos utilizados en la producción de nucleótidos necesarios para la proliferación de linfocitos)
VX-740	artritis reumatoide	inhibidor de ICE interleucina-1 beta (la enzima convertora controla las vías que conducen a una respuesta inmunitaria agresiva)
VX-745	específico de la inflamación involucrado en la señalización química del inicio de la respuesta inmunitaria y la progresión de la inflamación	inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógeno quinasa P38MAP

Anticuerpo	Indicación	Antígeno diana
Enbrel (etanercept)		dirigido a TNF (factor de necrosis tumoral)
IL-8		Anticuerpo monoclonal completamente humano contra IL-8 (interleucina 8)
Apogen MP4		El antígeno recombinante destruye selectivamente las células T asociadas a la enfermedad. Induce la apoptosis. Las células T eliminadas por muerte celular programada ya no atacan a las propias células del organismo. Los apógenos específicos se dirigen a células T específicas.

5.7.3 AGENTES PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

En algunas descripciones, las moléculas de la descripción se pueden administrar combinadas con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa. También se describe el uso de las moléculas de la descripción combinadas con antibióticos conocidos por los expertos en la técnica para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa. Los antibióticos que se pueden utilizar combinados con las moléculas de la descripción incluyen, pero sin limitarse a, macrólidos (p. ej., tobramicina (Tobi®)), una cefalosporina (p. ej., cefalexina (Keflex®), cefradina (Velosef®), cefuroxima (Ceftin®), cefprozil (Cefzil®), cefaclor (Ceclor®), cefixima (Suprax®) o cefadroxilo (Duricef®)), una claritromicina (p. ej., claritromicina (Biaxin®)), una eritromicina (p. ej., eritromicina (EMycin®)), una penicilina (p. ej., penicilina V (V-Cillin K® o Pen Vee K®)) o una quinolona (p. ej., ofloxacin (Floxin®), ciprofloxacina (Cipro®) o norfloxacina (Noroxin®)), antibióticos aminoglucósidos (p. ej., apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, neomicina, neomicina, undecilenato, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina y espectinomina), antibióticos de anfenicol (p. ej., azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol y tiamfenicol), antibióticos de ansamicina (p. ej., rifamida y rifampicina), carbacefemos (p. ej., loracarbef), carbapenemos (p. ej., biapenemo e imipenemo), cefalosporinas (p. ej., cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, ceftiofan, cefepim, cefpiramida y cefpiroma), cefamicinas (p. ej., cefbuperazona, cefmetazol y cefminox), monobactams (p. ej., aztreonam, carumonam y tigemonam), oxacefemos (p. ej., flomoxef y moxalactama), penicilinas (p. ej., amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamcicina, hidroyoduro de penetamato, penicilina o-ben-etamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penimepicilina y fencihicilina potasio), lincosamidas (p. ej., clindamicina y lincomicina), anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracina, enviomicina, tetraciclinas (p. ej., apiciclina, clortetraciclina, clomociclina y demeclociclina), 2,4-diaminopirimidinas (p. ej., brodimoprim), nitrofuranos (p. ej., furaltadona y cloruro de furazolio), quinolonas y análogos de las mismas (p. ej., cinoxacina, clinafloxacina, flumequina y grepagloxacina), sulfonamidas (p. ej., acetil sulfametoxipirazina, bencilsulfamida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, sulfacrisoidina y sulfacitina), sulfonas (p. ej., diatimosulfona, glucosulfona sódica y solasulfona), cicloserina, mupirocina y tuberina.

En ciertas descripciones, las moléculas de la descripción se pueden administrar combinadas con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antifúngicos. Los agentes antifúngicos que se pueden utilizar combinados con las moléculas de la descripción incluyen, pero sin limitarse a, anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, fluconazol, intratecal, flucitosina, miconazol, butoconazol, clotrimazol, nistatina, terconazol, tioconazol, ciclopirox, econazol, haloprogrina, naftifina, terbinafina, undecilenato y griseofulvina.

En algunas descripciones, las moléculas de la descripción se pueden administrar en combinadas con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más agentes antivirales. Los agentes antivirales útiles que se pueden utilizar en combinados con las moléculas de la descripción incluyen, pero sin limitarse a, inhibidores de proteasa, inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa y análogos de nucleósidos. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero sin limitarse a, zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina, así como foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, ritonavir, los alfa-interferones; adefovir, clevadina, entecavir, pleconaril.

5.8 TERAPIA CON VACUNAS

También se describe una composición para inducir una respuesta inmunitaria contra un agente antigénico o inmunogénico, que incluye, pero sin limitarse a, antígenos cancerosos y antígenos de enfermedades infecciosas (ejemplos de los cuales se divulgan más abajo). Las composiciones de vacuna comprenden uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos frente a los cuales se desea una respuesta inmunitaria, en donde los uno o más agentes antigénicos o inmunogénicos están recubiertos con una variante del anticuerpo descrito en el presente documento que

tiene una mayor afinidad por FcyRIIIA. Las composiciones de vacuna son particularmente eficaces para provocar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora contra el agente antigénico o inmunogénico.

En algunas descripciones, el agente antigénico o inmunogénico en las composiciones de vacuna comprende un virus contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. Los virus pueden ser recombinantes o quiméricos y preferiblemente están atenuados. La producción de virus recombinantes, quiméricos y atenuados se puede realizar utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. También se describe una vacuna viral recombinante viva o una vacuna viral recombinante inactivada que se formulará según la descripción del presente documento. Puede preferirse una vacuna viva porque la multiplicación en el anfitrión conduce a un estímulo prolongado de tipo y magnitud similar al que se produce en las infecciones naturales y, por lo tanto, confiere una inmunidad sustancial y duradera. La producción de tales formulaciones de vacunas de virus recombinantes vivos se puede lograr utilizando métodos convencionales que implican la propagación del virus en cultivo celular o en la alantoides del embrión de pollo seguido de purificación.

En una descripción específica, el virus recombinante no es patógeno para el sujeto al que se administra. En este sentido, el uso de virus genéticamente modificados con fines vacunales puede requerir la presencia de características de atenuación en estas cepas. La introducción de mutaciones apropiadas (p. ej., deleciones) en los moldes utilizados para la transfección pueden proporcionar a los nuevos virus características de atenuación. Por ejemplo, mutaciones sin sentido específicas que están asociadas con la sensibilidad a la temperatura o la adaptación al frío pueden convertirse en mutaciones de delección. Estas mutaciones deberían ser más estables que las mutaciones puntuales asociadas con mutantes sensibles al frío o a la temperatura y las frecuencias de reversión deberían ser extremadamente bajas. Las tecnologías de ADN recombinante para modificar genéticamente virus recombinantes son conocidas en la técnica. Por ejemplo, en la técnica se conocen mecanismos para modificar virus de ARN de hebra negativa, véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.166.057.

Alternativamente, se pueden construir virus quiméricos con características "suicidas" para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Tales virus pasarían sólo por una o unas pocas rondas de replicación dentro del anfitrión. Cuando se utiliza como vacuna, el virus recombinante pasaría por ciclos de replicación limitados e induciría un nivel suficiente de respuesta inmunitaria, pero no avanzaría más en el anfitrión humano ni causaría enfermedad. Alternativamente, se pueden formular virus inactivados (muertos). Se pueden preparar formulaciones de vacunas inactivadas utilizando técnicas convencionales para "matar" los virus quiméricos. Las vacunas inactivadas están "muertas" en el sentido de que su infectividad ha sido destruida. Lo ideal es destruir la infectividad del virus sin afectar a su inmunogenicidad. Para preparar vacunas inactivadas, el virus quimérico se puede cultivar en cultivo celular o en la alantoides del embrión de pollo, purificar mediante ultracentrifugación zonal, inactivar con formaldehído o β -propiolactona y combinar.

En ciertas descripciones, se pueden modificar genéticamente epítopos completamente foráneos, incluidos antígenos derivados de otros patógenos virales o no virales, en el virus para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Por ejemplo, se pueden modificar genéticamente antígenos de virus no relacionados tales como el VIH (gp160, gp120, gp41), antígenos de parásitos (p. ej., malaria), antígenos bacterianos o fúngicos o antígenos tumorales en la cepa atenuada.

Virtualmente se puede construir cualquier secuencia génica heteróloga en los virus quiméricos para su uso en las formulaciones de vacunas intradérmicas. Preferiblemente, las secuencias de genes heterólogos son restos y péptidos que actúan como modificadores de la respuesta biológica. Preferiblemente, se pueden expresar epítopos que inducen una respuesta inmunitaria protectora a cualquiera de una variedad de patógenos, o antígenos que se unen a anticuerpos neutralizantes, mediante o como parte de los virus quiméricos. Por ejemplo, las secuencias de genes heterólogos que pueden construirse en los virus quiméricos incluyen, pero sin limitarse a, hemaglutinina-neuraminidasa de influenza y parainfluenza y glicoproteínas de fusión tales como los genes HN y F del PIV3 humano. En otra descripción más, las secuencias de genes heterólogos que pueden modificarse genéticamente en los virus quiméricos incluyen aquellas que codifican proteínas con actividades inmunomoduladoras. Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, pero sin limitarse a, citocinas, interferón tipo 1, interferón gamma, factores estimulantes de colonias, interleucina -1, -2, -4, -5, -6, -12 y antagonistas de estos agentes.

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

En descripciones alternativas, las composiciones de vacuna comprenden un polipéptido de fusión en donde un agente antigénico o inmunogénico está conectado operativamente a una variante del anticuerpo descrito en el presente documento que tiene una mayor afinidad por FcyRIIIA. La modificación genética de polipéptidos de fusión para su uso en las composiciones de vacunas se realiza utilizando métodos de tecnología de ADN recombinante de rutina y está dentro del nivel del conocimiento práctico habitual.

También se describen métodos para inducir tolerancia en un sujeto mediante la administración de una composición. Preferiblemente, una composición adecuada para inducir tolerancia en un sujeto comprende un agente antigénico o inmunogénico recubierto con una variante del anticuerpo descrito en el presente documento, en donde la variante del

anticuerpo tiene una mayor afinidad por FcγRIIB. Aunque no se desea limitarse a un mecanismo de acción particular, tales composiciones son eficaces para inducir tolerancia activando la vía inhibidora mediada por FcγRIIB.

5.9 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

También se describen métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de la descripción (es decir, diacuerpos) que comprenden dominios de unión a epítomos múltiples y, opcionalmente, un dominio Fc (o porción del mismo). También se describen métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada como se describe en el presente documento. En una descripción preferida, un anticuerpo, una proteína de fusión o una molécula conjugada están sustancialmente purificadas (es decir, sustancialmente libres de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En una descripción específica, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero tal como no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (p. ej., mono tal como, un mono cangrejero y un ser humano). En una descripción preferida, el sujeto es un ser humano. En otra descripción preferida más, el anticuerpo es de la misma especie que el sujeto.

Se conocen varios sistemas de suministro y pueden utilizarse para administrar una composición que comprende moléculas de la descripción, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (Véase, p. ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de administración de una molécula de la descripción incluyen, pero sin limitarse a, administración parenteral (p. ej., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (p. ej., vía intranasal y oral). En una descripción específica, las moléculas de la descripción se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, también se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente aerosolizante. (Véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 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 Núm. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

También se describe que las moléculas de la descripción están envasadas en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de anticuerpo. En una descripción, las moléculas de la descripción se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un producto concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado y se pueden reconstituir, p. ej., con agua o solución salina hasta la concentración adecuada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de la descripción se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosificación unitaria de al menos 5 mg, más preferiblemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. Las moléculas liofilizadas de la descripción deben almacenarse entre 2 y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferiblemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas o dentro de 1 hora después de ser reconstituidas. En una descripción alternativa, las moléculas de la descripción se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, la forma líquida de las moléculas de la descripción se suministra en un recipiente herméticamente cerrado de al menos 1 mg/ml, más preferiblemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml de las moléculas.

La cantidad de composición que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis precisa que se empleará en la formulación dependerá también de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y deberá decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba in vitro o de modelos animales.

Para los diacuerpos abarcados por la descripción, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferiblemente, la dosis administrada a un paciente está entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosis y frecuencia de administración de los diacuerpos de la descripción se pueden reducir o alterar mejorando la absorción y la penetración tisular de los diacuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una descripción, la dosificación de las moléculas de la descripción administradas a un paciente es de 0,01 mg a 1.000 mg/día, cuando se utilizan como terapia de agente único. En otra descripción, las moléculas de la descripción

se utilizan combinadas con otras composiciones terapéuticas y las dosificaciones administradas a un paciente son más bajas que cuando dichas moléculas se utilizan como terapia de agente único.

En una descripción específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en la zona que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y sin carácter limitante, por infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como, membranas sialásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la descripción, se debe tener cuidado de utilizar materiales a los que no se absorba la molécula.

En otra descripción, las composiciones se pueden suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (Véanse Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989).; López-Berestein, ídem., págs. 3 17-327; véase generalmente ídem.).

En otra descripción más, las composiciones se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Se puede utilizar cualquier mecanismo conocido por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más moléculas de la descripción. (Véanse p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.526.938; la Publicación PCT WO 91/05548; la Publicación PCT WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una descripción, se puede utilizar una bomba en un sistema de liberación controlada (Véanse Langer, más arriba; 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 descripción, se pueden utilizar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de anticuerpos (véanse, p. ej., Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Véanse también Levy 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 Núm. 5.679.377; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.916.597; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.912.015; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.989.463; la Patente de Estados Unidos Núm. 5.128.326; la Publicación PCT Núm. WO 99/15154; y Publicación PCT Núm. WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitarse a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En otra descripción más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica (p. ej., los pulmones), requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, más arriba, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). En otra descripción, se utilizan composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada según Dunn et al. (Véase el documento U.S. 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación generalmente puede ocurrir en cualquier parte del organismo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. En otra descripción, se utiliza un sistema de suministro sostenido no polimérico, mediante el cual se utiliza un implante no polimérico en el organismo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el organismo, el disolvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición al fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida. Véase el documento U.S. 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se comentan en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533). Se puede utilizar cualquier mecanismo conocido por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la descripción. (Véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.526.938; las Publicaciones Internacionales Núm. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al., 1996, Radiotherapy and 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 descripción específica donde la composición es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo de la descripción, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que se vuelva intracelular, p. ej., mediante el uso de un vector retroviral (Véase la Patente de Estados Unidos Núm. 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubriéndolo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo conectado a un péptido tipo homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (Véanse, p. ej., Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico intracelularmente e incorporarlo dentro del ADN de la célula anfitriona para su expresión mediante recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de moléculas de la descripción puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata a un sujeto con moléculas de la descripción en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 y 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras descripciones, 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 descripciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación eficaz de las moléculas utilizadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento particular.

5.9.1 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (p. ej., composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Tales 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 descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de diacuerpo de la descripción y un anticuerpo terapéutico (p. ej., anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una descripción específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (p. ej., adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, 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 se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un producto concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indican la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a, aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5.9.2 TERAPIA GÉNICA

En una descripción específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican moléculas de la descripción se administran para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta descripción, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo o proteína de fusión codificados que median un efecto terapéutico o profiláctico.

Se puede utilizar cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica. A continuación, se describen métodos ilustrativos.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse, 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. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden utilizarse son descritos por Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990).

Una composición puede comprender ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la descripción, siendo dichos ácidos nucleicos parte de un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un anfitrión adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, conectados operablemente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra descripción particular, se utilizan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes del anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

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 anfitrión adecuado. En particular, tales ácidos nucleicos tienen promotores, preferiblemente promotores heterólogos, conectados operablemente a la región codificante de una proteína de fusión, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido. En otra descripción particular, se utilizan moléculas de ácido nucleico en las que la secuencia codificante de la proteína de fusión y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica de la proteína de fusión.

El suministro de los ácidos nucleicos a un sujeto puede ser directo, en cuyo caso el sujeto se expone directamente al ácido nucleico o a los vectores portadores de ácidos nucleicos, o indirecto, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, a continuación, se trasplantan al sujeto. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex-vivo*.

En una descripción específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, p. ej., construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo para que se vuelvan intracelulares, p. ej., por infección utilizando vectores retrovirales u otros vectores virales defectuosos o atenuados (véase la Patente de Estados Unidos Núm. 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas conectadas a un péptido que se sabe que ingresa al núcleo, administrándolo conectado a un antígeno sujeto a endocitosis mediada por receptores (Véase p. ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (que puede utilizarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra descripción, se pueden formar complejos de ácido nucleico-antígeno en donde un antígeno comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra descripción más, el ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión celular específica, dirigiéndose a un receptor específico (Véanse p. ej., las Publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188; WO 93/20221). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula anfitriona para su expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; y Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

En una descripción específica, se utilizan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de la descripción (p. ej., un anticuerpo o una proteína de fusión). Por ejemplo, se puede utilizar un vector retroviral (Véase Miller et al., 1993, Meth. Enzimol. 217:581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y su integración en el ADN de la célula anfitriona. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o una proteína de fusión que se van a utilizar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Se pueden encontrar más detalles sobre los vectores retrovirales en Boesen et al., (1994, Biotherapy 6:291-302), que describe el uso de un vector retroviral para suministrar el gen *mdr 1* a las células madre hematopoyéticas con el fin de hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en 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 virales que se pueden utilizar en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes a los epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otras dianas de los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. 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) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68: 143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; Publicación PCT WO94/12649; y Wang et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783. En una descripción preferida, se utilizan vectores de adenovirus.

También se ha propuesto el uso del virus adenoasociado (AAV) en terapia génica (véase, p. ej., Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 y Patente de Estados Unidos Núm. 5.436.146).

Otro enfoque de la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejidos mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. A continuación, las células se someten a selección para aislar aquellas células que han absorbido y expresan el gen transferido. A continuación, esas células se suministran a un sujeto.

En esta descripción, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago, que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosos mecanismos en la técnica para la introducción de genes foráneos en las células (Véanse p. ej., Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzimol. 217:599-618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzimol. 217:618-644; y Clin. Pharma. Ther. 29:69-92, 1985) y se pueden utilizar siempre que no se alteren las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de manera que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden administrar a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (p. ej., células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferiblemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la técnica.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico con fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible deseada e incluyen, pero sin limitarse 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 o progenitoras hematopoyéticas, p. ej., obtenidas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una descripción preferida, la célula utilizada para la terapia génica es autóloga para el sujeto.

En una descripción en la que se utilizan células recombinantes en terapia génica, se introducen en las células secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo o una proteína de fusión de manera que sean expresables por las células o su progenie, y después se administran las células recombinantes *in vivo* para obtener un efecto terapéutico. En una descripción específica, se utilizan células madre o progenitoras. Se puede utilizar cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* potencialmente según esta descripción (Véanse, p. ej., la Publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

En una descripción específica, el ácido nucleico que se va a introducir con fines de terapia génica comprende un promotor inducible conectado operablemente a la región codificante, de manera que la expresión del ácido nucleico se puede controlar controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

5.9.3 KITS

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con las moléculas de la descripción. Adicionalmente, también se pueden incluir en el paquete o kit farmacéutico uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Opcionalmente asociado con tal o tales contenedores puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

También se describen kits que se pueden utilizar en los métodos anteriores. En una descripción, un kit comprende una o más moléculas de la descripción. En otra descripción, un kit comprende adicionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes. En otra descripción, un kit comprende adicionalmente uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos cancerosos asociados con el cáncer. En ciertas descripciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente

quimioterapéutico. En otras descripciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

5.10 CARACTERIZACIÓN Y DEMOSTRACIÓN DE LA UTILIDAD TERAPÉUTICA

Preferiblemente se prueban *in vitro* varios aspectos de las composiciones farmacéuticas, agentes profilácticos o terapéuticos descritos en el presente documento, en un sistema de cultivo celular, y en un organismo modelo animal, tal como un sistema modelo animal de roedor, para determinar la actividad terapéutica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos que se pueden utilizar para determinar si se desea la administración de una composición farmacéutica específica, incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido de un paciente se hace crecer en 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 tal composición sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido se puede obtener mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la molécula profiláctica o terapéutica terapéuticamente más eficaz para cada paciente individual. En varias descripciones específicas, se pueden realizar ensayos *in vitro* con células representativas de tipos de células implicadas en un trastorno autoinmunitario o inflamatorio (p. ej., células T), para determinar si una composición farmacéutica descrita en el presente documento tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células.

Se pueden probar combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Tales sistemas de modelos animales incluyen, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede utilizarse cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Se pueden probar combinaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos en un sistema modelo de ratón. Tales sistemas modelo se utilizan ampliamente y son bien conocidos por el experto en la técnica. Los agentes profilácticos y/o terapéuticos se pueden administrar repetidamente. Varios aspectos del procedimiento pueden variar. Dichos aspectos incluyen el régimen temporal de administración de los agentes profilácticos y/o terapéuticos, y si tales agentes se administran por separado o como una mezcla.

Los modelos animales preferidos para su uso en los métodos del presente documento son, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan FcγR humanos en células efectoras de ratón, p. ej., se puede utilizar cualquier modelo de ratón descrito en el documento U.S. 5.877.396. Los ratones transgénicos para su uso en los métodos incluyen, pero sin limitarse a, ratones portadores de FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIIA humano; ratones portadores de FcγRIIB humano y FcγRIIA humano. Preferiblemente, las mutaciones que muestran los niveles más altos de actividad en los ensayos funcionales descritos anteriormente se probarán para su uso en estudios de modelos animales antes de su uso en seres humanos. Se pueden preparar cantidades suficientes de anticuerpos para su uso en modelos animales utilizando los métodos descritos anteriormente, por ejemplo, utilizando sistemas de expresión de mamíferos y métodos de purificación divulgados e ilustrados en el presente documento.

Se pueden utilizar modelos de xenoinjerto de ratón para examinar la eficacia de los anticuerpos de ratón generados contra una diana específica de tumor basándose en la afinidad y especificidad de los dominios de unión a epítipo de la molécula de anticuerpo de la descripción y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta inmunitaria (Wu et al., 2001, Trends Cell Biol. 11: T2-9). Los ratones transgénicos que expresan FcγR humanos en células efectoras de ratón son únicos y son modelos animales hechos a medida para probar la eficacia de las interacciones Fc-FcγR humanos. Se pueden utilizar pares de líneas de ratones transgénicos FcγRIIIA, FcγRIIB y FcγRIIA generadas en el laboratorio del Dr. Jeffrey Ravetch (a través de un acuerdo de licencia con Rockefeller U. y Sloan Kettering Cancer Center), tales como los que se enumeran en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Cepas de ratones

Fondo de cepa	FcR humano
Desnudo/CD16AKO	Ninguno
Desnudo / CD16A KO	FcγRIIIA
Desnudo / CD16A KO	FcγR IIA
Desnudo / CD16A KO	FcγR IIA y IIIA
Desnudo / CD32B KO	Ninguno
Desnudo / CD32B KO	FcγR IIB

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas se puede determinar utilizando diversos modelos animales experimentales de artritis inflamatoria conocidos en la técnica y descritos por Crofford L.J. y Wilder R.L., en "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 se pueden utilizar modelos animales experimentales y espontáneos de artritis inflamatoria y enfermedades reumáticas autoinmunitarias para evaluar la actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas. Los siguientes son algunos ensayos proporcionados como ejemplos y no como limitación.

Los principales modelos animales para artritis o enfermedad inflamatoria conocidos en la técnica y ampliamente utilizados incluyen: modelos de rata con artritis inducida por adyuvante, modelos de rata y ratón con artritis inducida por colágeno y modelos de rata, conejo y hámster con artritis inducida por antígeno, todos descritos por 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).

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas se puede evaluar utilizando un modelo de rata con artritis inducida por carragenano. La artritis inducida por carragenano también se ha utilizado en conejos, perros y cerdos en estudios de artritis o inflamación crónica. La evaluación histomorfométrica cuantitativa se utiliza para determinar la eficacia terapéutica. Los métodos para utilizar tal modelo de artritis inducida por carragenano son descritos por Hansra P. et al., "Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat", *Inflammation*, 24(2): 141-155, (2000). También se utilizan comúnmente modelos animales de inflamación inducida por zimosano como se conocen y describen en la técnica.

La actividad antiinflamatoria de las terapias combinadas también se puede evaluar midiendo la inhibición del edema de la pata inducido por carragenano en la rata, utilizando una modificación del método descrito por 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.* 111, 544-547, (1962). Este ensayo se ha utilizado como principal escrutinio *in vivo* para determinar 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 dosificado vehículo.

Además, los modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal también se pueden utilizar para evaluar la eficacia de las terapias combinadas (Kim et al., 1992, *Scand. J. Gastroenterol.* 27:529-537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(12 suppl):3S-10S). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades inflamatorias del intestino humano que pueden inducirse en animales. Los polisacáridos sulfatados que incluyen, pero sin limitarse a, amilopectina, carragenina, sulfato de amilopectina y sulfato de dextrano o irritantes químicos que incluyen, pero sin limitarse a, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y ácido acético, se pueden administrar a animales por vía oral para inducir enfermedades inflamatorias intestinales.

También se pueden utilizar modelos animales para trastornos autoinmunitarios para evaluar la eficacia de las terapias combinadas. Se han desarrollado modelos animales para trastornos autoinmunitarios tales como la diabetes 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. Nefrol.* 19:12-24).

Adicionalmente, se puede utilizar cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias divulgadas en el presente documento para enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

La toxicidad y eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan índices terapéuticos grandes. Si bien se pueden utilizar agentes profilácticos y/o terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de suministro que dirija tales agentes al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular una variedad de dosificaciones de agentes profilácticos y/o terapéuticos para uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en el método descrito en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

La actividad anticancerosa de las terapias utilizadas según la presente descripción también puede determinarse mediante el uso de diversos modelos animales experimentales para el estudio del cáncer tales como el modelo de ratón SCID o ratones transgénicos o ratones desnudos con xenoinjertos humanos, modelos animales, tales como como hámsteres, conejos, etc. conocidos en la técnica y descritos en *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development* (1999, eds. Fiebig y Burger); *Contributios to Oncology* (1999, Karger); *The Nuce Mouse in Oncology Research* (1991, eds. Boven y Winograd); y *Anticancer Drug Development Guide* (1997 ed. Teicher).

Los modelos animales preferidos para determinar la eficacia terapéutica de las moléculas de la descripción son modelos de xenoinjerto de ratón. Las líneas de células tumorales que se pueden utilizar como fuente para tumores de xenoinjerto incluyen, pero sin limitarse a, células SKBR3 y MCF7, que pueden obtenerse de pacientes con adenocarcinoma de mama. Estas células tienen receptores tanto erbB2 como de prolactina. Las células SKBR3 se han utilizado de forma rutinaria en la técnica como modelos de tumores de xenoinjerto y ADCC. Alternativamente, se pueden utilizar células OVCAR3 derivadas de un adenocarcinoma de ovario humano como fuente para tumores de xenoinjerto.

Los protocolos y composiciones se prueban preferiblemente *in vitro*, y después *in vivo*, para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Los agentes y métodos terapéuticos pueden seleccionarse utilizando células de un tumor o línea celular maligna. Se pueden utilizar muchos ensayos convencionales en la técnica para evaluar la supervivencia y/o el crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular se puede analizar midiendo la incorporación de ³H-timidina, mediante recuento celular directo, mediante la detección de cambios en la actividad transcripcional de genes conocidos tales como protooncogenes (p. ej., fos, myc) o marcadores del ciclo celular; la viabilidad celular se puede evaluar mediante tinción con azul tripán, la diferenciación se puede evaluar visualmente en función de los cambios en la morfología, la disminución del crecimiento y/o la formación de colonias en agar blando o la formación de una red tubular en una membrana basal tridimensional o una preparación de matriz extracelular, etc.

Los compuestos para su uso en terapia pueden probarse en sistemas de modelos animales adecuados antes de probarlos en seres humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, hámsteres, etc., por ejemplo, los modelos animales descritos anteriormente. A continuación, los compuestos se pueden utilizar en los ensayos clínicos apropiados.

Adicionalmente, se puede utilizar cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de las terapias combinatorias divulgadas en el presente documento para el tratamiento o la prevención del cáncer, el trastorno inflamatorio o la enfermedad inmunitaria.

6. EJEMPLOS

6.1 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BISPECÍFICOS COVALENTES

Se construyeron un diacuerpo covalente monoespecífico y un diacuerpo covalente biespecífico para evaluar las características de producción, purificación y unión recombinantes de cada uno. Se descubrió mediante análisis SDS-PAGE y SEC que las moléculas de diacuerpos purificadas por afinidad que se produjeron mediante los sistemas de expresión recombinantes descritos en el presente documento consistían en una única especie dimérica. Los análisis ELISA y SPR revelaron adicionalmente que el diacuerpo biespecífico covalente exhibía afinidad por ambos antígenos diana y podía unirse a ambos antígenos simultáneamente.

Materiales y métodos:

Construcción y Diseño de Moléculas Polipeptídicas: Se diseñaron vectores de expresión de ácidos nucleicos para producir cuatro construcciones polipeptídicas, representadas esquemáticamente en la FIG. 2. La construcción 1 (SEQ ID NO:9) comprendía el dominio VL del anticuerpo 2B6 humanizado, que reconoce FcyRIIB, y el dominio VH del anticuerpo 3G8 humanizado, que reconoce FcyRIIA. La construcción 2 (SEQ ID NO:11) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu2B6. La construcción 3 (SEQ ID NO:12) comprendía el dominio VL de Hu3G8 y el dominio VH de Hu3G8. La construcción 4 (SEQ ID NO:13) comprendía el dominio VL de Hu2B6 y el dominio VH de Hu2B6.

Construcción de vectores de expresión y PCR: Las secuencias codificantes de los dominios VL o VH se amplificaron a partir de ADN molde utilizando cebadores directos e inversos diseñados de manera que los productos de PCR iniciales contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de las construcciones polipeptídicas deseadas.

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

Se amplificó VL de Hu2B6 a partir de la cadena ligera de Hu2B6 utilizando los cebadores directos e inversos de SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, respectivamente. Se amplificó VH de Hu2B6 a partir de la cadena pesada de Hu2B6 utilizando los cebadores directos e inversos de SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60, respectivamente. Se amplificó VL de Hu3G8 a partir de la cadena ligera de Hu3G8 utilizando los cebadores directos e inversos de SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 61, respectivamente. Se amplificó VH de Hu3G8 a partir de la cadena pesada de Hu3G8 utilizando los cebadores directos e inversos de SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63, respectivamente.

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

PCR solapante: Los productos de PCR iniciales se combinaron como se describe a continuación y se amplificaron utilizando las mismas condiciones de PCR descritas para la amplificación inicial del ADN molde. Los productos de PCR solapante también se purificaron como se describe más arriba.

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

Los cebadores directos de los dominios VL (es decir, SEQ ID NO:57) y los cebadores inversos de los dominios VH (es decir, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:63) contenían sitios de restricción únicos para permitir la clonación del producto final en un vector de expresión. Los productos de PCR solapante purificados se digirieron con endonucleasas de restricción Nhe I y EcoRI y se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, Inc.). Los plásmidos que codificaban construcciones se designaron como se identifica en la Tabla 12:

Tabla 12. CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS

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

Expresión de polipéptido/diacuerpo: Se cotransfectó pMGX0669, que codifica la construcción 1, con pMGX0667, que codifica la construcción 2, en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cotransfección de estos dos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico covalente (CBD) inmunoespecífico tanto para FcyRIIB como para FcyRIIA (el diacuerpo h2B6-h3G8). Se transfectaron por separado pMGX0666 y pMGX0668, que codificaban las construcciones 3 y 4, respectivamente, en células HEK-293 para la expresión de un diacuerpo monoespecífico covalente (CMD), inmunoespecífico para FcyRIIA (diacuerpo h3G8) y FcyRIIB (diacuerpo h2B6), respectivamente. Después de tres días en cultivo, los productos secretados se purificaron de los medios acondicionados.

Purificación: Los diacuerpos se capturaron del medio acondicionado utilizando los antígenos relevantes acoplados a Sefarosa 4B activada con CNBr. La resina de afinidad Sepharose se equilibró en Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 antes de la carga. Después de la carga, la resina se lavó con tampón de equilibrado antes de la elución. Los diacuerpos se eluyeron de la resina lavada utilizando glicina 50 mM, pH 3,0. Los diacuerpos eluidos se neutralizaron inmediatamente con Tris/HCl 1 M, pH 8,0, y se concentraron utilizando un concentrador de tipo centrifugación. Los diacuerpos concentrados se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 200 equilibrada en PBS.

SEC: Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño para analizar el tamaño aproximado y la heterogeneidad de los diacuerpos eluidos de la columna. El análisis SEC se realizó en una columna GE Healthcare Superdex 200HR

10/30 equilibrada con PBS. Se utilizaron como controles la comparación con los perfiles de elución de una IgG de longitud completa (~150 kDa), un fragmento Fab (~50 kDa) y un Fv monocatenario (~30 kDa).

ELISA: La unión de los diacuerpos eluidos y purificados se caracterizó mediante ensayo ELISA, como se describe en 5.4.2. Se aplicaron como recubrimiento 50 µl/pocillo de una solución de 2 µg/ml de sCD32B-Ig sobre una placa Maxisorp de 96 pocillos en tampón carbonato a 4°C durante la noche. La placa 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 temperatura ambiente. Posteriormente, se diluyeron CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6 o CMD h3G8 en el tampón de bloqueo en una serie de diluciones dobles para generar un rango de concentraciones de diacuerpos, de 0,5 µg/ml a 0,001 µg/ml. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se añadieron a cada pocillo 50 µl/pocillo de 0,2 µg/ml de sCD16A-biotina. La placa se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS-T tres veces, se utilizaron para la detección 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de estreptavidina conjugada con HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Se dejó incubar la HRP-estreptavidina durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS-T tres veces y se reveló utilizando 80 µl/pocillo de sustrato TMB. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción HRP-TMB se detuvo añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ al 1%. La DO450 nm se leyó utilizando un lector de placas de 96 pocillos y el soporte lógico SOFTmax, y los resultados se representaron utilizando el soporte lógico GraphPadPrism 3.03.

Ensayo BIAcore: Los parámetros cinéticos de la unión de diacuerpos eluidos y purificados se analizaron utilizando un ensayo BIAcore (BIAcore instrument 1000, BIAcore Inc., Piscataway, Nueva Jersey) y el soporte lógico asociado como se describe en la sección 5.4.3.

Se inmovilizaron sCD16A, sCD32B o sCD32A (control negativo) en una de las cuatro celdas de flujo (celda de flujo 2) de la superficie de un chip sensor mediante química de acoplamiento de aminas (mediante modificación de grupos carboximetilo con una mezcla de NHS/EDC) de manera que se inmovilizaron sobre la superficie aproximadamente 1000 unidades de respuesta (RU) de cualquiera de los receptores. Después de esto, los ésteres activos que no habían reaccionado se "completaron" con una inyección de Et-NH₂ 1 M. Una vez preparada una superficie adecuada, se pasaron diacuerpos biespecíficos covalentes (CBD h2B6-h3G8) o diacuerpos monoespecíficos covalentes (CMD h2B6 o CMD h3G8) sobre la superficie mediante inyecciones de 180 segundos de una solución de 6,25-200 nM a un caudal de 70 ml/min. También se probó el scFv de h3G8 a efectos de comparación.

Una vez que se recopiló un conjunto completo de datos, las curvas de unión resultantes se ajustaron globalmente utilizando algoritmos informáticos proporcionados por el fabricante, 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 de equilibrio aparente, K_D como la razón de las dos constantes de velocidad (es decir, K_{off}/K_{on}). Se pueden encontrar tratamientos más detallados sobre cómo se obtienen las constantes de velocidad individuales en el Manual de soporte lógico de BIAevaluation (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las fases de asociación y disociación se ajustaron por separado. La constante de velocidad de disociación se obtuvo para el intervalo de 32 a 34 segundos de la fase de disociación de 180 segundos; el ajuste de fase de asociación se obtuvo mediante un modelo de Langmuir 1:1 y el ajuste de base se seleccionó basándose en los criterios de R_{max} y chi² para los diacuerpos biespecíficos y scFv; Se utilizó ajuste de analito bivalente para la unión de CMD.

Resultados

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

El análisis SEC de cada uno de los productos del sistema de expresión también reveló una única especie molecular (FIG. 4B), cada una de las cuales eluyó aproximadamente al mismo tiempo que un fragmento Fab de 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 CMD y un heterodímero covalente homogéneo para el caso del CBD h2B6-h3G8.

Se utilizó un ensayo sándwich ELISA para probar la unión de CBD h2B6-h3G8 para determinar la especificidad para uno cualquiera o ambos de CD32B y/o CD16A (FIG. 5). CD32B sirvió como antígeno diana y CD16A se utilizó como sonda secundaria. La señal positiva en el ELISA reveló que el CBD heterodimérico h2B6-h3G8 tenía especificidad para ambos antígenos. Pruebas similares del CMD h3G8 (que no debería unirse a CD32B) no mostraron señal.

El análisis SPR indicó que CMD h3G8 reconoció inmunoespecíficamente sCD16, pero no sCD32B, que CMD h2B6 reconoció inmunoespecíficamente sCD32B, pero no sCD16, y que CBD h2B6-h3G8 reconoció inmunoespecíficamente tanto sCD16 como sCD32B (FIGs. 6A-B). Ninguno de los diacuerpos probados se unió al receptor de control, sCD32A (FIG. 6C).

El análisis SPR también se utilizó para estimar las constantes cinéticas y de equilibrio de los CMD y del CBD h2B6-h3G8 a sCD16 y/o sCD32B. Los resultados se compararon con las mismas constantes calculadas para un scFv h3G8. Las FIG. 7A-E muestran los resultados gráficos del análisis SPR. Las velocidades cinéticas de asociación y disociación, 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 datos de BIAcore.

Receptor/Analito	k-on	k-off	Kd
diacuerpo sCD16 / h3G8	$2,3 \times 10^5$	0,004	18,0
sCD16 / CDB h2B6-h3G8	$4,6 \times 10^5$	0,010	22,7
sCD16 / scFv h3G8	$3,2 \times 10^5$	0,013	38,7
sCD32B / CDB h2B6-h3G8	$3,6 \times 10^5$	0,005	15,0
sCD32B / diacuerpo h2B6	$6,2 \times 10^5$	0,013	21,0

Junto con los resultados del análisis ELISA, los estudios confirman que el heterodímero covalente h2B6-h3G8 conservaba la especificidad tanto para CD32B como para CD16, y era capaz de unirse a ambos antígenos simultáneamente. La molécula está representada esquemáticamente en la FIG. 8.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPOS BISPECÍFICOS COVALENTES QUE COMPRENDEN DOMINIOS Fc

En un esfuerzo por crear una molécula similar a IgG, es decir, que comprende un dominio Fc, uno de los polipéptidos que comprenden la molécula heterodimérica de CBD presentada en el Ejemplo 6.1 se modificó para que comprendiera adicionalmente un dominio Fc (creando una cadena "más pesada" y "más ligera", análoga a una cadena pesada y ligera de un anticuerpo). La molécula heterodimérica biespecífica contendría entonces un dominio Fc que se dimerizará con una molécula homóloga, formando una molécula tetramérica similar a IgG con tetravalencia (es decir, formada por dimerización a través de los dominios Fc de las moléculas biespecíficas heterodiméricas). Curiosamente, tales moléculas tetraméricas no se detectaron en los medios acondicionados de sistemas de expresión recombinantes utilizando ensayos funcionales, p. ej., probando los medios acondicionados para determinar la unión inespecífica a los antígenos diana. En cambio, en tales ensayos funcionales sólo se detectó una molécula dimérica, que comprendía monómeros que consistían en un dominio VL, VH y Fc. Para probar si la estabilidad de la estructura tetramérica teórica estaba en juego, los polipéptidos que comprendían el dominio Fc se modificaron genéticamente para que comprendieran adicionalmente una región bisagra, mientras que los polipéptidos que comprendían la cadena "más ligera" se modificaron genéticamente para que comprendieran adicionalmente los 6 aminoácidos C-terminales del dominio constante de la cadena ligera kappa humana. Cuando tales cadenas 'más pesada' y 'más ligera' remodeladas genéticamente se coexpresaron en los sistemas de expresión recombinantes, los ensayos funcionales detectaron moléculas de diacuerpos que eran capaces de unirse inespecíficamente tanto a los antígenos diana como a los anticuerpos anti-Fc.

30 Materiales y métodos

Construcción y Diseño de 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. Las construcciones 5 (SEQ ID NO: 14) y 6 (SEQ ID NO: 15) se crearon mediante modificación genética de las construcciones 1 y 2, respectivamente, para que comprendieran adicionalmente un dominio Fc. La construcción 7 (SEQ ID NO: 16) se creó modificando genéticamente la construcción 1 para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO: 23) en su extremo C-terminal. La construcción 8 (SEQ ID NO: 18) se creó modificando genéticamente la construcción 2 para que comprendiera adicionalmente una región bisagra y un dominio Fc (que comprende la mutación V215A). En la FIG. 9 se muestra la representación esquemática de las construcciones 5-8.

PCR y construcción de vectores de expresión: Todos los protocolos de PCR y purificación de productos de PCR fueron los descritos 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 HuIgG y/o el dominio bisagra fueron SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:5, respectivamente. Las secuencias codificantes de los ADN molde se amplificaron utilizando cebadores directos e inversos de manera que los productos de la PCR contuvieran secuencias solapantes, permitiendo que la PCR solapante generara las secuencias codificantes de los productos deseados.

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

PCR solapante: Los productos de la PCR inicial se combinaron como se describe a continuación, se amplificaron y purificaron como se describe en el ejemplo 6.1.

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

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. Los plásmidos que codificaban las construcciones se designaron como se identifica en la Tabla 14:

Tabla 14. CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS

Construcción codificante	Designación de plásmido	Inserto
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3G8VL-hu2B6VH-hubisagra-Fc (A215V)

Expresión de polipéptidos/diacuerpos: Se realizaron cuatro cotransfecciones separadas en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0674, que codificaban las construcciones 1 y 6, respectivamente; pMGX0667 y pMGX0676, que codificaban las construcciones 2 y 5, respectivamente; y pMGX0677 y pMGX0678, que codificaban las construcciones 7 y 8, respectivamente.

La cotransfección de estos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura similar a IgG, inmunoespecífico tanto para FcγRIIB como para FcγRIIA. También se realizó una cotransfección adicional: pMGX0674 y pMGX0676, que codificaban las construcciones 6 y 5, respectivamente. Después de tres días en cultivo, se recogieron los medios acondicionados. La cantidad de producto secretado en el medio acondicionado se cuantificó mediante ELISA anti-Fc de IgG utilizando Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones de producto en las muestras en función de la cuantificación y se utilizaron las muestras normalizadas para los ensayos restantes.

ELISA: La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas al medio se analizó mediante ELISA tipo sándwich como se describe, más arriba. A menos que se indique, se utilizó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16 conjugado con HRP como sonda.

Resultados

Se utilizó un ensayo ELISA para probar las muestras normalizadas de los sistemas de expresión recombinantes que comprendían las construcciones 1 y 6 (pMGX669-pMGX674), las construcciones 2 y 5 (pMGX667-pMGX676) y las construcciones 5 y 6 (pMGX674-pMGX676) para determinar la expresión de moléculas de diacuerpo capaces de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A (FIG. 10). Los datos de ELISA indicaron que la cotransfección con las construcciones 1 y 6 o la cotransfección con las construcciones 2 y 5 no lograron producir un producto que pudiera unirse a uno o ambos antígenos (FIG. 10, □ y ▲, respectivamente). Sin embargo, la cotransfección de las construcciones 5 y 6 conduce a la secreción de un producto capaz de unirse a los antígenos CD32B y CD16. El último producto era un dímero de las construcciones 5 y 6, que contenía un sitio de unión para cada antígeno con una estructura representada esquemáticamente en la FIG. 11.

Para impulsar la formación de una estructura heterotetramérica similar a IgG, la secuencia codificante de seis aminoácidos adicionales se añadió al extremo C de la construcción 1, generando la construcción 7 (SEQ ID NO: 16 y mostrada esquemáticamente en la FIG. 9). Los seis aminoácidos adicionales, FNRGEC (SEQ ID NO:23), se obtuvieron del extremo C-terminal de la cadena ligera Kappa y normalmente interactúan con el dominio bisagra superior de la cadena pesada en una molécula de IgG. A continuación, se modificó genéticamente un dominio bisagra en la construcción 6, generando la construcción 8 (SEQ ID NO: 18 y FIG. 9). La construcción 8 comprendía adicionalmente una mutación de aminoácido en la región bisagra superior, A215V. Los plásmidos de expresión que codificaban la construcción 7 y la construcción 8, pMGX677 y pMGX678, respectivamente, se cotransfectaron después en células HEK-293 y se expresaron como se describe.

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

Como antes, la molécula producida por el sistema de expresión que comprendía las construcciones 1 y 6 (pMGX669 + pMGX674) resultó incapaz de unirse tanto a CD32A como a CD16A (FIG. 10 y 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) fueron capaces de unirse tanto a CD32B como a CD16 (FIG. 12). Cabe señalar que la construcción 7 es análoga a la construcción 1, con la excepción de que la construcción 7 comprende la secuencia C-terminal FNRGEC (SEQ ID NO:23); y que la construcción 8 es análoga a la construcción 6, excepto que la construcción 8 comprende un dominio bisagra y la mutación A215V. Los datos indican que la adición de los 6 aminoácidos adicionales del extremo C de la cadena ligera C-kappa (FNRGEC; SEQ ID NO:23) a la cadena "más ligera" que no porta Fc ayudó a estabilizar la formación de las moléculas de diacuerpos tetraméricos similares a IgG, independientemente de si la cadena más pesada correspondiente comprendía un dominio bisagra (es decir, pMGX0677 + pMGX0674 y pMGX0677-pMGX0678, FIG. 12). La adición del dominio bisagra al polipéptido "más pesado" que porta Fc, sin la adición de la secuencia C-terminal de FNRGEC (SEQ ID NO:23) a la cadena "más ligera" correspondiente, aparentemente no pudo efectuar una estabilización similar (es decir, falta de unión por producto de la cotransfección de las construcciones 2 y 8 (pMGX669 + pMGX678)). La estructura de la molécula de diacuerpo tetramérico se representa esquemáticamente en la FIG. 13.

6.3 EFECTO DEL ORDEN DE LOS DOMINIOS Y ENLACES DISULFURO ADICIONALES SOBRE LA FORMACIÓN DE DIACUERPOS TETRAMERICOS TIPO IgG

El efecto de la estabilización adicional entre las cadenas polipeptídicas "más ligeras" y "más pesadas" de la molécula de diacuerpo tetramérico similar a IgG se investigó mediante la sustitución de restos seleccionados en las cadenas polipeptídicas con cisteínas. Los restos de cisteína adicionales proporcionan enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas "más pesadas" y "más ligeras". Adicionalmente, se investigó el orden de los dominios sobre la actividad de unión moviendo el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc desde el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica al extremo N-terminal. Aunque la actividad de unión de la molécula que comprende los enlaces disulfuro adicionales no se alteró con respecto a las moléculas de diacuerpo construidas anteriormente con tales enlaces, la transferencia del dominio Fc o bisagra-Fc al extremo N-terminal de la cadena polipeptídica "más pesada" que comprende el diacuerpo mejoró sorprendentemente la afinidad de unión y/o la avidez de la molécula biespecífica hacia uno o ambos de sus antígenos diana.

Materiales y métodos

Construcción y Diseño de 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 (SEQ ID NO: 19) y la construcción 10 (SEQ ID NO: 20) (ambas mostradas esquemáticamente en la FIG. 13) eran análogas a las construcciones 8 y 6, con la excepción de que el dominio Fc o el dominio bisagra-Fc, respectivamente, se desplazaron del extremo C-terminal del polipéptido al extremo N-terminal. Adicionalmente, todos los dominios Fc utilizados fueron dominios Fc de IgG1 de tipo salvaje. La construcción 11, SEQ ID NO:21 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 2 del Ejemplo 6.1 excepto que el extremo C-terminal se diseñó para que comprendiera adicionalmente la secuencia FNRGEC (SEQ ID NO:23). La construcción 12, SEQ ID NO: 22 (mostrada esquemáticamente en la FIG. 14) era análoga a la construcción 5 del Ejemplo 6.2 excepto que el dominio Fc comprendía adicionalmente una región bisagra. Asimismo, 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 manera que una glicina en cada dominio se reemplazaba por cisteína.

PCR y construcción de vectores de expresión: Todos los protocolos de PCR y purificación de productos de PCR fueron los descritos en los Ejemplos 6.1 y 6.2.

PCR solapante: Los productos finales se construyeron, amplificaron y purificaron utilizando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y el ejemplo 6.2.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. Los plásmidos que codificaban las construcciones se designaron como se identifica en la Tabla 15:

Tabla 15. CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS

Construcciones codificantes	Designación de plásmido	Inserto
9	pMGX0719	Bisagra/Fc-hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc-hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-hubisagraFC
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH(G/C)-FNRGEC

- 5 *Expresión de Polipéptidos/diacuerpos:* Se realizaron tres cotransfecciones separadas en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: pMGX0669 y pMGX0719, que codificaban las construcciones 1 y 9, respectivamente; pMGX0669 y pMGX0718, que codificaban las construcciones 1 y 10, respectivamente; y pMGX0617 y pMGX0717, que codificaban las construcciones 11 y 12, respectivamente. La cotransfección de estos plásmidos se diseñó para conducir a la expresión de un diacuerpo biespecífico (CBD) de tetravalencia con estructura similar a IgG, inmuno-específico tanto para Fc γ RIIB como para Fc γ RIIA. Después de tres días en cultivo, se recogieron los medios acondicionados. La cantidad de producto secretado en el medio acondicionado se cuantificó mediante ELISA anti-Fc de IgG utilizando Fc purificado como patrón. A continuación, se normalizaron las concentraciones de producto en las muestras en función de la cuantificación y se utilizaron las muestras normalizadas para los ensayos restantes.
- 10
- 15 *ELISA:* La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas al medio se analizó mediante ELISA tipo sándwich como se describe, más arriba. A menos que se indique, se utilizó CD32B para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16 conjugado con HRP como sonda.

- 20 *Transferencia Western:* Se analizaron aproximadamente 15 ml de medio acondicionado de las tres cotransfecciones descritas anteriormente mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se tiñó un gel con Simply Blue Safestain (Invitrogen) y se transfirió un gel idéntico a una membrana de PVDF (Invitrogen) utilizando métodos de transferencia convencionales. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada en polvo en 1X PBS. A continuación, la membrana se incubó en 10 ml de anti- H+L de IgG1 humana de cabra conjugada con HRP diluida 1:8.000 en leche desnatada en polvo al 2%, 1XPBS/Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Después de un lavado con 1X PBS/Tween 20 al 0,3%, 2X 5 min cada uno, después 20 min a temperatura ambiente, la membrana se reveló con el sistema de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. La película fue revelada en un procesador de rayos X.
- 25

Resultados

- Los medios acondicionados de los sistemas de expresión recombinantes que comprendían las construcciones 1 y 9; las construcciones 1 y 10; y las construcciones 11 y 12 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) y transferencia Western (utilizando una anti-IgG como sonda). La transferencia Western reveló que el producto de los sistemas que comprendían las construcciones 11 y 12 o que comprendían las construcciones 9 y 1 formaba predominantemente una única especie de molécula de aproximadamente 150 kDa (FIG. 14, calles 3 y 2, respectivamente). Ambos productos tienen enlaces disulfuro internos modificados genéticamente entre las cadenas "más ligera" y "más pesada" que componen el diacuerpo. Por el contrario, la molécula sin enlaces disulfuro internos modificados genéticamente entre las cadenas "más ligera" y "más pesada", formada por las construcciones 10 y 1, formó al menos dos especies moleculares de pesos moleculares de ~75 y ~100 kDa (FIG. 14, calle 1).
- 30
- 35

- A pesar de los resultados de la Transferencia Western, se encontró que cada uno de los tres productos era capaz de unirse tanto a CD32A como a CD16 (FIG. 15). Sorprendentemente, con respecto al producto que comprende un dominio bisagra-Fc C-terminal (formado por las construcciones 11 y 12), el producto de ambos sistemas en donde el dominio Fc (o Fc-bisagra) estaba en el extremo amino de la cadena polipeptídica que contenía Fc (es decir, la cadena "más pesada") (construcciones 9+1 y construcciones 10+1) demostró una mayor afinidad y/o aidez hacia uno o ambos de sus péptidos diana (es decir CD32B y/o CD16).
- 40

- 6.4 EFECTO DEL SITIO DE ESCISIÓN INTERNO/EXTERNO SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PRECURSOR DE POLIPROTEÍNA Y LA EXPRESIÓN DEL DIACUERPO BISPECÍFICO COVALENTE; DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE DIACUERPO BISPECÍFICO QUE COMPRENDE PORCIONES DE CADENA LAMBDA Y DOMINIO DE BISAGRA DE IgG HUMANA**
- 45

Como se describe en el presente documento, las cadenas polipeptídicas individuales del diacuerpo o molécula de diacuerpo de la descripción pueden expresarse como una única molécula precursora de poliproteína. La capacidad de los sistemas recombinantes descritos en los Ejemplos 6.1-6.3 para procesar y expresar adecuadamente un CBD funcional a partir de dicho precursor de poliproteína se probó mediante modificación genética de un ácido nucleico para codificar tanto la primera como la segunda cadenas polipeptídicas de un CBD separadas por un sitio de escisión interno, en particular, un sitio de escisión de furina. El CBD funcional, se aisló del sistema recombinante que comprendía la molécula precursora de la poliproteína.

Como se analiza en el Ejemplo 6.3, se descubrió que la adición de los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, FNRGEC (SEQ ID NO:23), estabilizaba la formación de diacuerpos, presumiblemente a través de una interacción mejorada entre cadenas entre los dominios que comprendían SEQ ID NO:23 y aquellos dominios que comprendían un dominio Fc o un dominio bisagra-Fc. El efecto estabilizador de esta interacción similar a cadena lambda/Fc se probó en CBD en donde ninguna cadena polipeptídica comprendía un dominio Fc. Se modificó genéticamente una cadena polipeptídica del diacuerpo para que comprendiera SEQ ID NO:23 en su extremo C-terminal; la cadena polipeptídica asociada se modificó genéticamente para que comprendiera la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO: 79), que se obtuvo del dominio bisagra de una IgG. La comparación de este CBD con el compuesto por las construcciones 1 y 2 (del ejemplo 6.1) reveló que el CBD que comprendía los dominios obtenidos del dominio bisagra y la cadena lambda exhibió una afinidad ligeramente mayor por uno o ambos de sus epítomos diana.

Materiales y métodos

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

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 15 (SEQ ID NO:101) (FIG.17) era análoga a la construcción 1 (SEQ ID NO:9), presentada en el ejemplo 6.1, con la excepción de que el extremo C-terminal de la construcción 15 comprendía la secuencia de aminoácidos FNRGEC (SEQ ID NO: 23). La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 15 se proporciona en SEQ ID NO:102. La construcción 16 (SEQ ID NO:103) (FIG. 17) era análoga a la construcción 2, presentada en el Ejemplo 6.1, con la excepción de que el extremo C-terminal de la construcción 16 comprendía la secuencia de aminoácidos VEPKSC (SEQ ID NO:79). La secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción 16 se proporciona en SEQ ID NO:104.

PCR y construcción de vectores de expresión: Todos los protocolos de PCR y purificación de productos de PCR fueron los descritos en los Ejemplos 6.1 y 6.2

PCR solapante: Los productos finales se construyeron, amplificaron y purificaron utilizando los métodos descritos en el ejemplo 6.1 y el ejemplo 6.2 con cebadores apropiados.

Los productos finales se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCIneo (Promega, Inc.) como se describió anteriormente. Los plásmidos que codificaban las construcciones se designaron como se identifica en la Tabla 16:

Tabla 16. CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS

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

Expresión de polipéptidos/diacuerpos: Se realizaron una transfección y una cotransfección en células HEK-293 utilizando Lipofectamine 2000, como se describe en la sección 6.1: única: pMGX0750, que codificaba la construcción 13; y cotransfección: pMGX0752 y pMGX0753, que codificaban las construcciones 15 y 16, respectivamente. Después

de tres días en cultivo, se recogieron los medios acondicionados y se purificó por afinidad el producto secretado como se describe.

- 5 ELISA: La unión de las moléculas de diacuerpo secretadas al medio se analizó mediante ELISA tipo sándwich como se describe, más arriba. Se utilizó CD32B murino para recubrir la placa, es decir, como proteína diana, y se utilizó CD16A conjugado con HRP como sonda para el producto de la cotransfección de las construcciones 15 y 16. Se utilizó mCD32B como proteína diana y se utilizó CD16A conjugada con biotina como sonda para el sistema recombinante que comprendía la construcción 13.

Resultados

- 10 Los medios acondicionados de los sistemas de expresión recombinantes que comprendían las construcciones 13 se analizaron mediante ELISA tipo sándwich. El ensayo ELISA probó la unión del CBD para determinar la especificidad de uno o ambos de mCD32B y/o CD16 (FIG. 18). CD32B sirvió como antígeno diana y CD16A se utilizó como sonda secundaria. La señal positiva en el ELISA reveló que el CBD heterodimérico h2.4G2-h3G8 producido a partir del precursor de la poliproteína tenía especificidad por ambos antígenos.
- 15 De manera similar, el producto purificado generado por cotransfección de los vectores que codificaban las construcciones 15 y 16 se analizó en un ensayo ELISA y se comparó con el producto compuesto por las construcciones 1 y 2 (Ejemplo 6.1). CD32B sirvió como antígeno diana y CD16A se utilizó como sonda secundaria. Al igual que con el producto compuesto por las construcciones 1 y 2, se encontró que el producto de las construcciones 15 y 16 era capaz de unirse simultáneamente a CD32B y CD16A. De hecho, el producto de las construcciones 15 y 16 mostró una afinidad ligeramente mejorada por uno o ambos antígenos diana, es decir CD32B o CD16A. Esto quizás se deba a una mayor estabilidad y/o fidelidad (con respecto a una interacción de dominio VH-VL de tipo salvaje) de la asociación entre cadenas proporcionada por la interacción de la región de la cadena lambda, FNRGEC (SEQ ID NO:23) y la región bisagra VEPKSC (SEQ ID NO:79), que está ausente en el producto compuesto por las construcciones 1 y 2.
- 20 Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su alcance, como resultará evidente para los expertos en la técnica. 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 adjuntas.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de diacuerpo que comprende una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, en donde:

(a) dicha primera cadena polipeptídica comprende en la dirección N-terminal a C-terminal:

- 5 (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de 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 cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2) específica para un segundo epítipo, y
- 10 (iii) un tercer dominio que comprende la secuencia de aminoácidos VEPKSC (**SEQ ID NO: 79**) o la mutación V215A de la misma que tiene la secuencia AEPKSC (restos de aminoácidos 245-250 de **SEQ ID NO: 18**);

y en donde dichos primer dominio y segundo dominio están conectados covalentemente entre sí mediante un conector peptídico de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácido, de manera que el primer dominio y el segundo dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo; y

(b) dicha segunda cadena polipeptídica comprende en la dirección N-terminal a C-terminal:

- 15 (i) un cuarto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2)
- (ii) un quinto dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y
- 20 (iii) un sexto dominio que comprende un dominio constante de cadena ligera que contiene cisteína que comprende los 6 restos de aminoácido C-terminales de un dominio constante de cadena ligera humana;

y en donde:

- (1) dichos cuarto dominio y quinto dominio están conectados covalentemente entre sí mediante un péptido de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácido, de manera que el cuarto dominio y el quinto dominio no se asocian para formar un sitio de unión a epítipo;
- 25 (2) dicha primera cadena polipeptídica y dicha segunda cadena polipeptídica están conectadas covalentemente mediante un enlace disulfuro entre dicho tercer dominio y dicho sexto dominio;
- (3) 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;
- 30 (4) dicho segundo dominio y dicho cuarto dominio se asocian para formar un segundo sitio de unión (VL2)(VH2) que se une al segundo epítipo;
- (5) dichos primer y segundo epítopos son diferentes; y
- (6) uno de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a un antígeno patogénico o un antígeno canceroso;

y en donde la molécula de diacuerpo es capaz de unirse simultáneamente al primer y segundo epítopos.

35 2. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho tercer dominio comprende adicionalmente un dominio Fc o una porción del mismo.

3. La molécula de diacuerpo de la reivindicación 2, en donde dicho tercer dominio comprende adicionalmente dicho dominio Fc.

4. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 5. La molécula de diacuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la composición farmacéutica según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno **caracterizados por** dicho antígeno patogénico o dicho antígeno canceroso, en donde uno de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a dicho antígeno patogénico o canceroso y el segundo de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula B, una célula T, una célula fagocítica, una célula asesina natural (NK) o una célula dendrítica.

45

6. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho antígeno expresado en la superficie de una célula B, una célula T, una célula fagocítica, una célula asesina natural (NK) o una célula dendrítica se selecciona del grupo que consiste en: CD3, CD16, CD32 o CD64.
- 5 7. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5 o 6, en donde dicha enfermedad o trastorno es un cáncer. **caracterizado por** un antígeno canceroso y en donde dicho uno de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a dicho antígeno canceroso.
- 10 8. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en donde dicho cáncer es un cáncer de vejiga, un cáncer de mama, un cáncer de origen mesenquimatoso, un cáncer del sistema nervioso central y periférico, un cáncer de cuello uterino, un cáncer de colon, un tumor hematopoyético de linaje linfóide, un tumor hematopoyético de linaje mielóide, un cáncer de riñón, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer de piel, un cáncer de estómago, un cáncer de tiroides o un cáncer de ovario.
- 15 9. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5 o 6, en donde dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad infecciosa y en donde dicho uno de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a un antígeno patogénico que es un antígeno bacteriano, un antígeno viral, o un antígeno fúngico que es característico de dicha enfermedad infecciosa.
- 20 10. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5 o 6, en donde dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria y en donde uno de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a un antígeno patogénico, y el otro de dicho primer y dicho segundo sitios de unión se une a un FcγRIIB.
- 25 11. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en: alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedad inmunitaria de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behçet, penfigoide ampoloso, miocardiopatía, dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis y vasculitis.
- 35 12. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en: asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), un trastorno alérgico, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria y una inflamación crónica resultante de una infección viral o bacteriana crónica.
- 40 13. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde dicho antígeno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y colágeno.
- 45 14. La molécula de diacuerpo o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en donde dicha enfermedad inmunitaria es una vasculitis seleccionada del grupo que consiste en dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

[illegible]

FIG. 1A

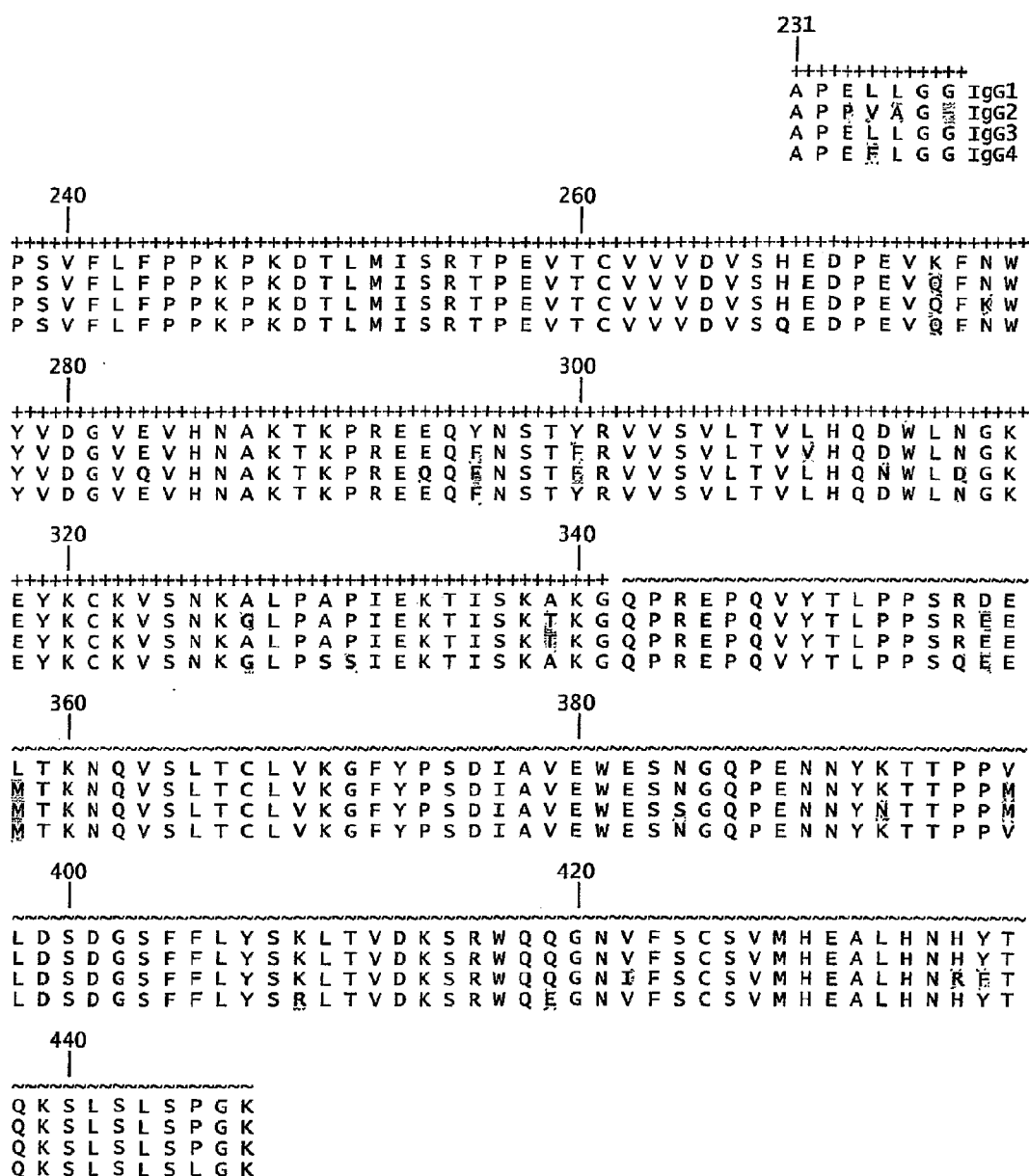


FIG. 1B

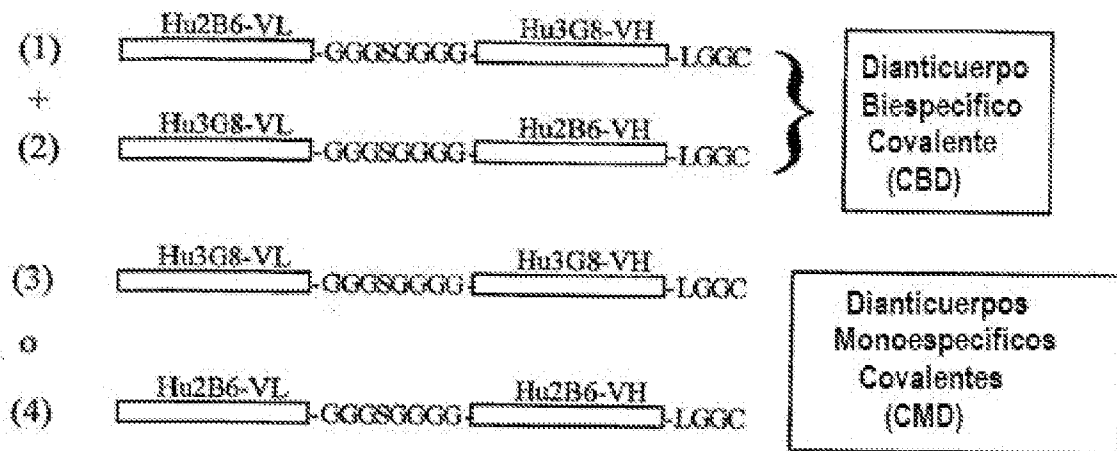


FIG. 2

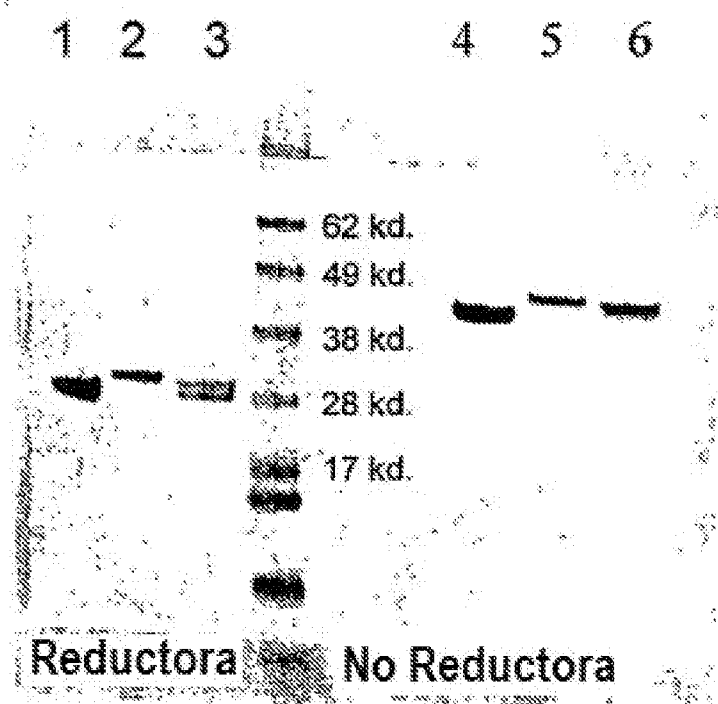


FIG. 3

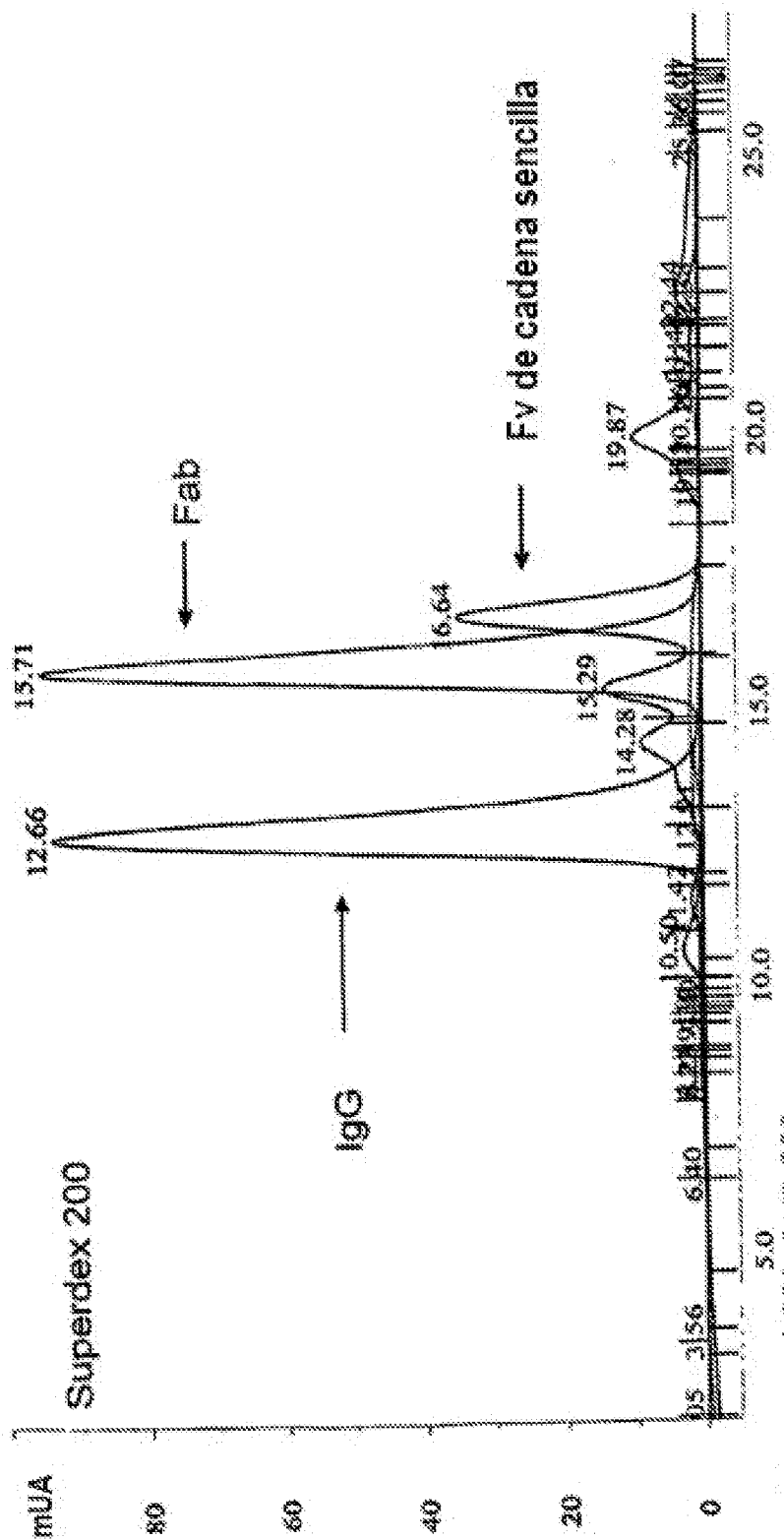


FIG. 4A

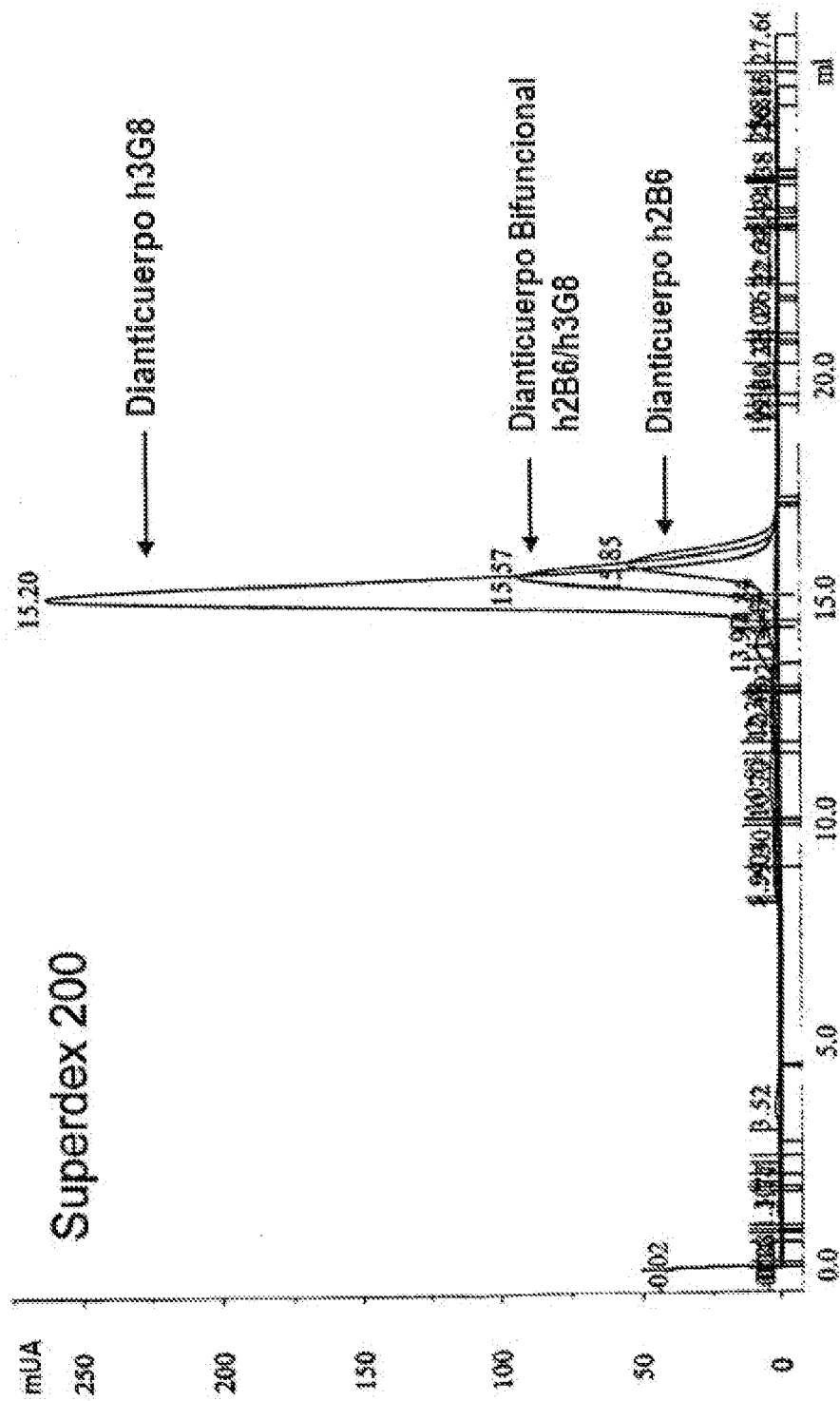
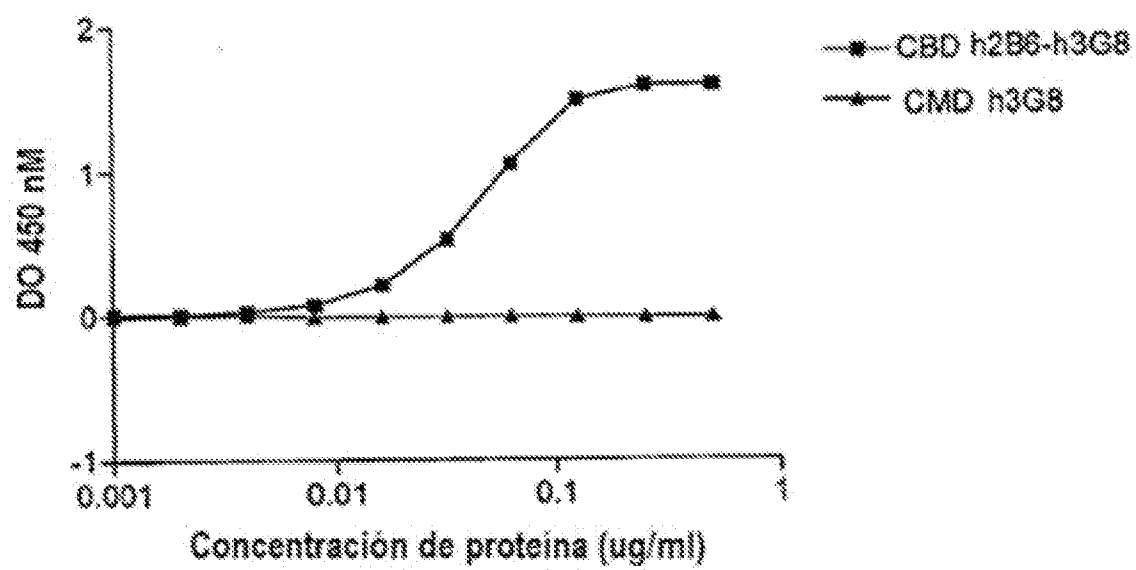


FIG. 4B

**FIG. 5**

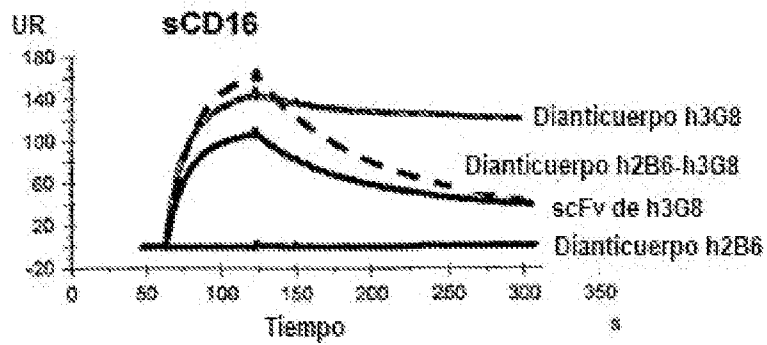


FIG. 6A

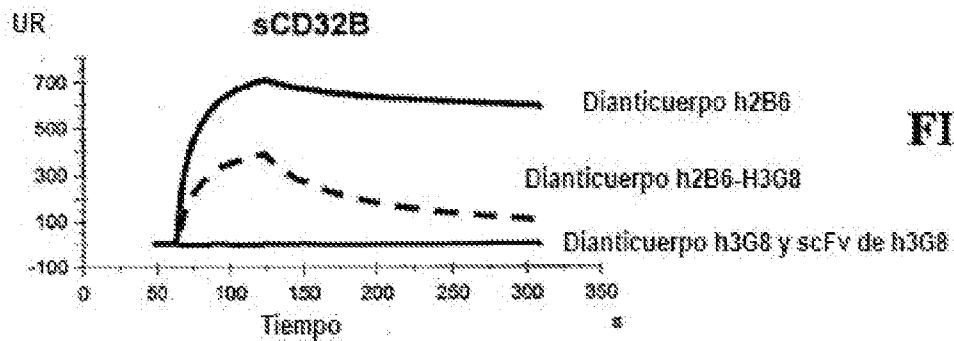


FIG. 6B

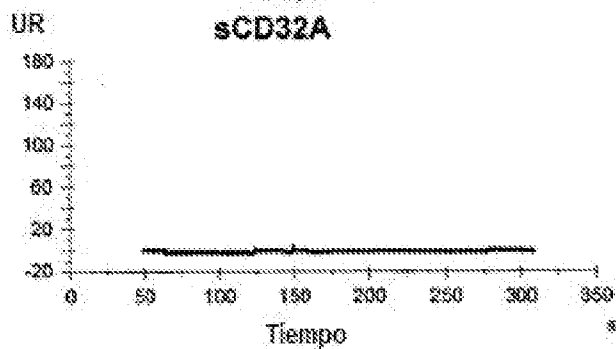


FIG. 6C

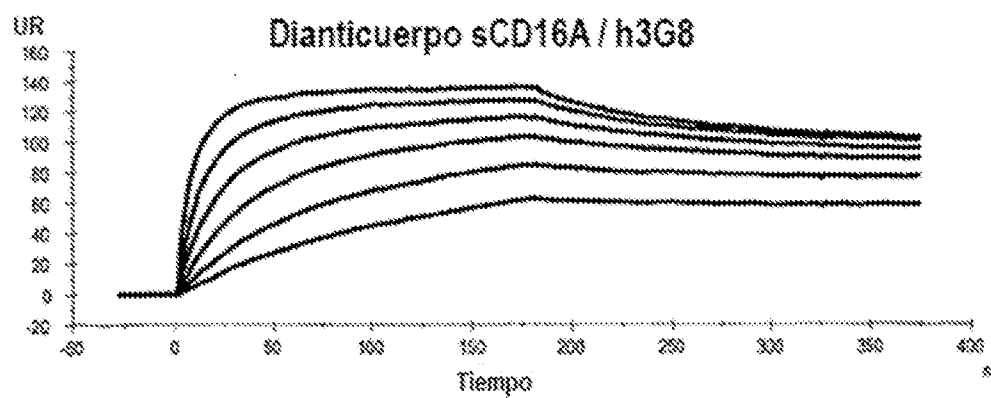


FIG. 7A

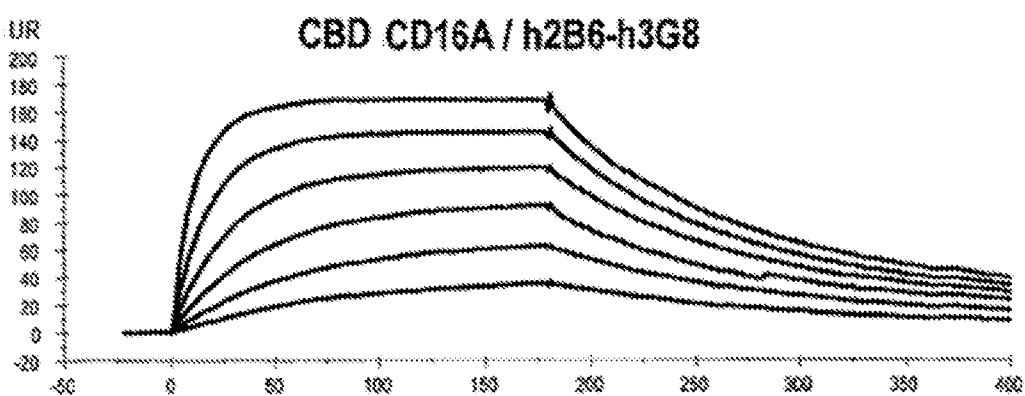


FIG. 7B

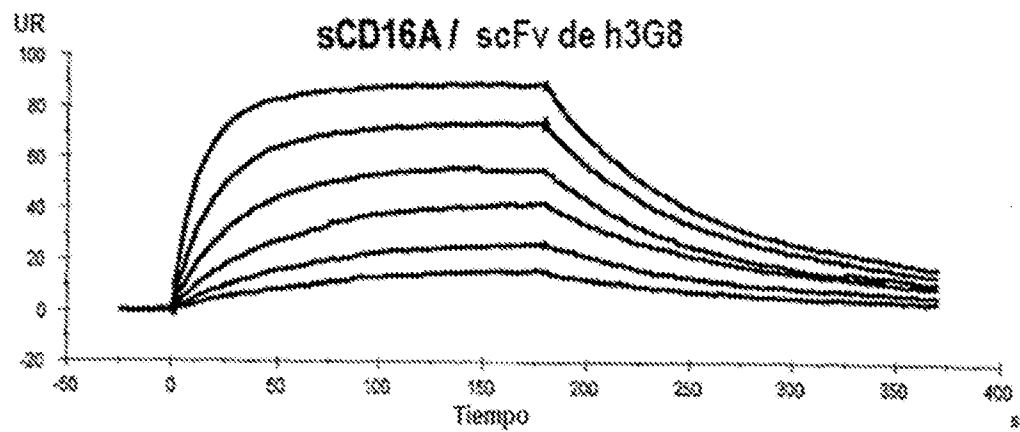


FIG. 7C

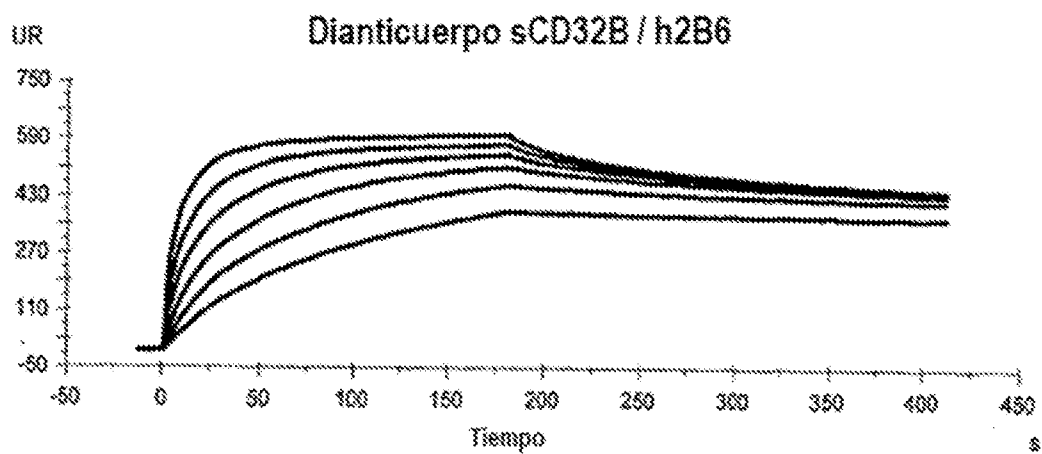


FIG. 7D

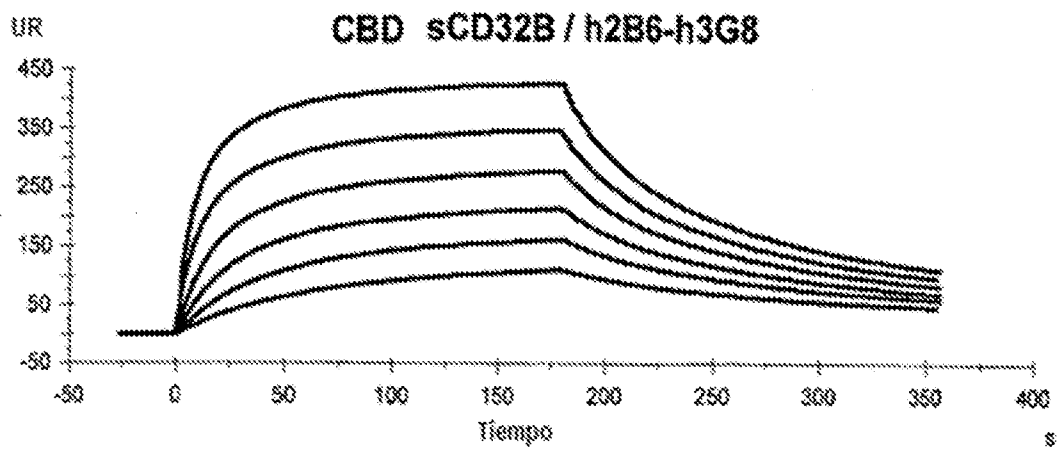


FIG. 7E

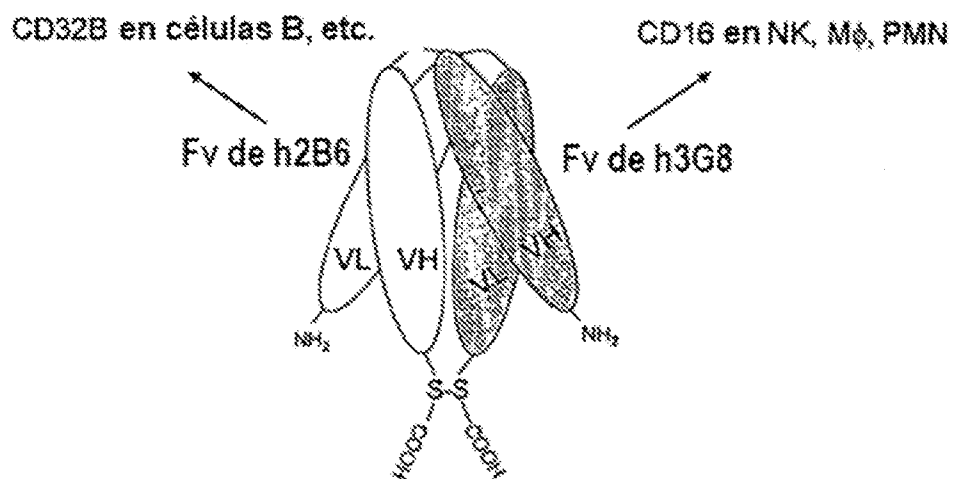


FIG. 8

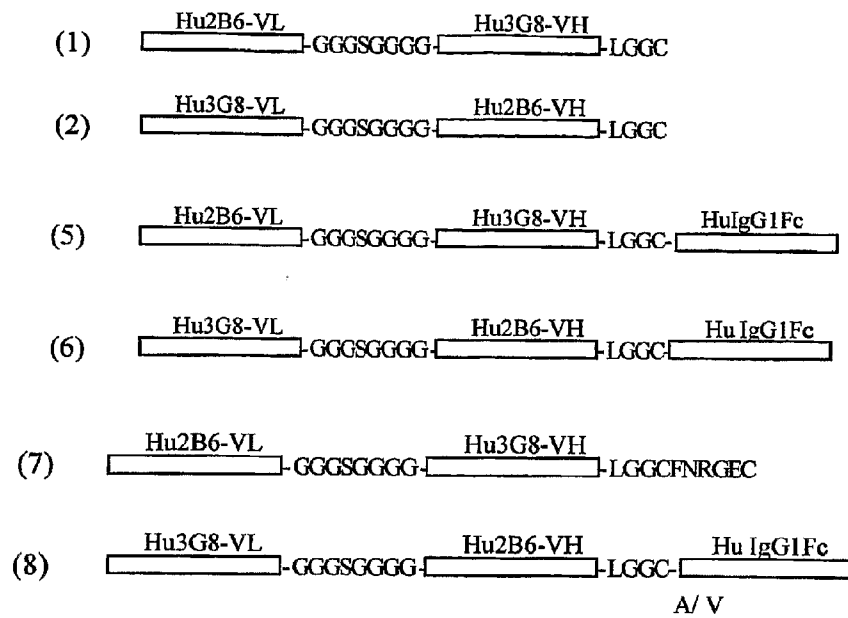
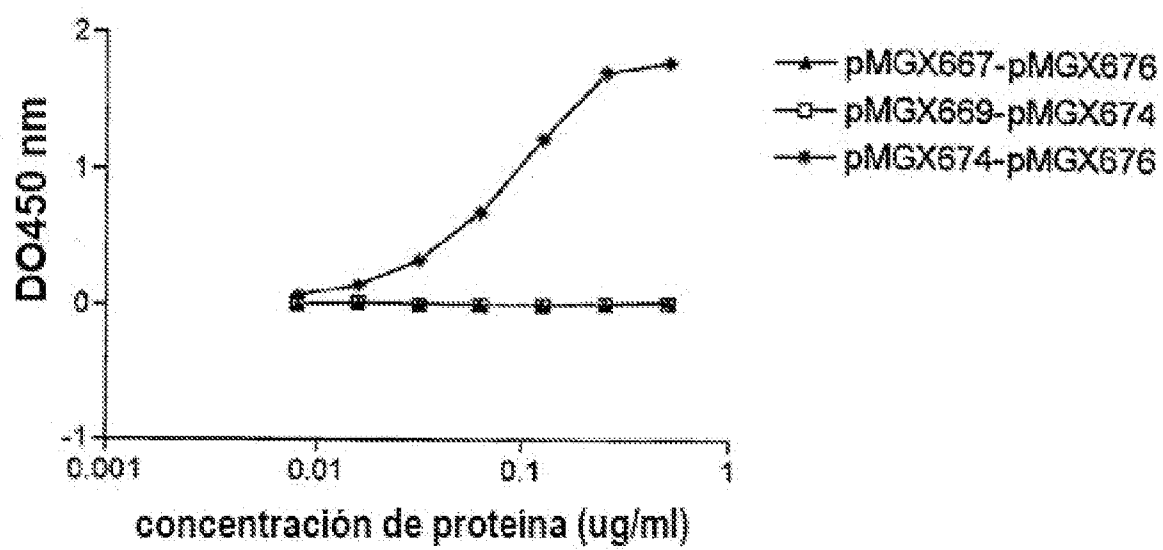


FIG. 9

**FIG. 10**

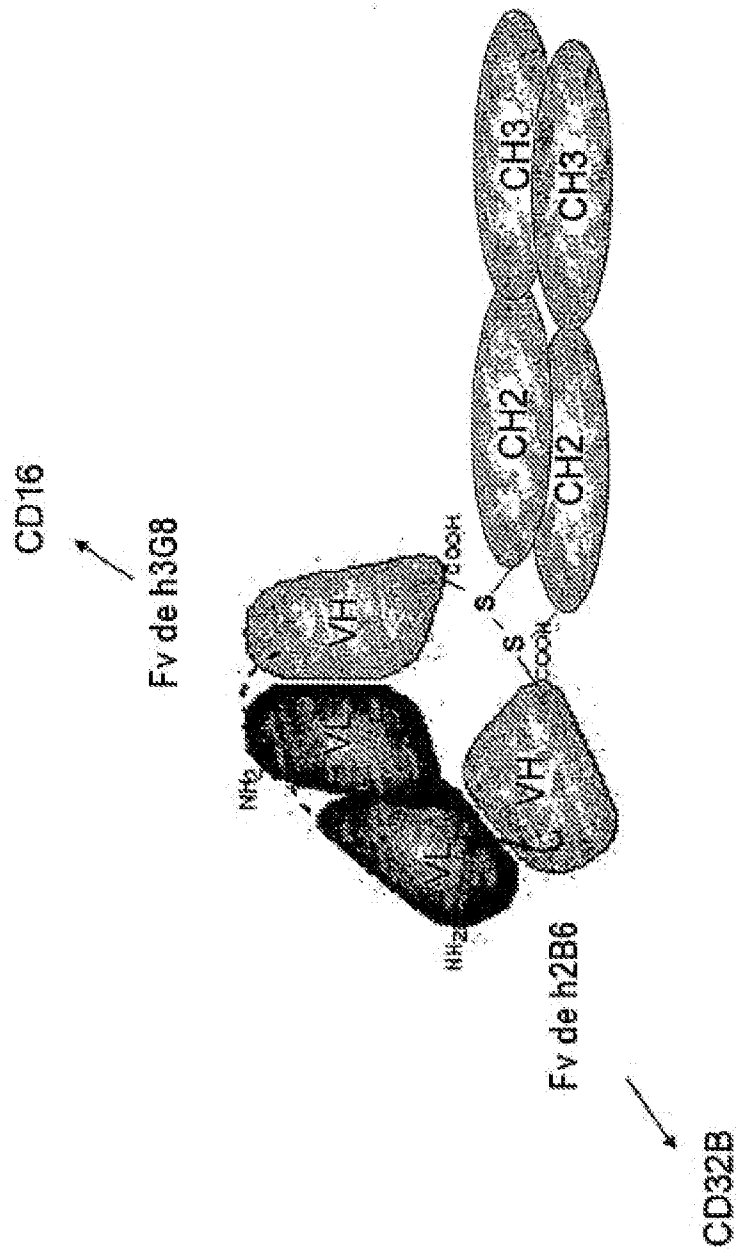


FIG. 11

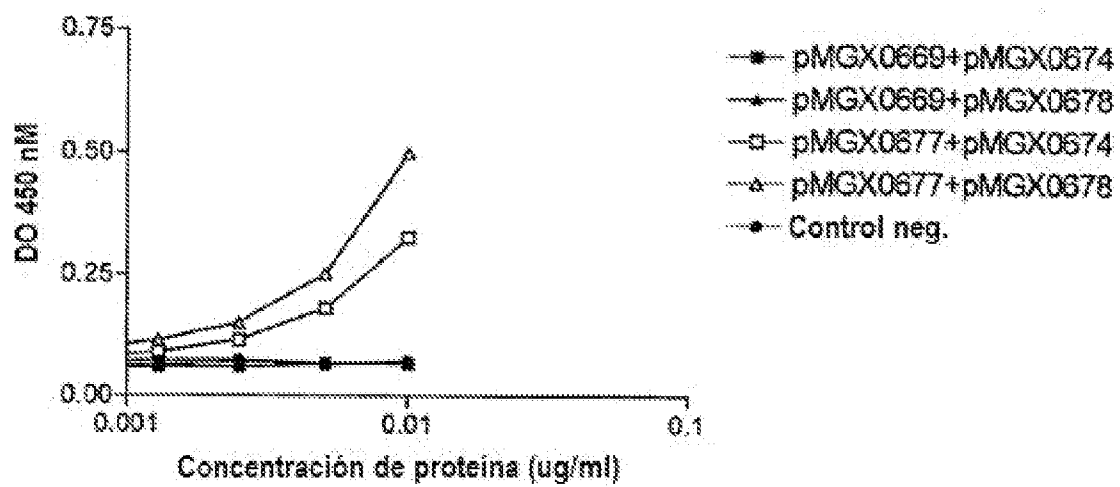


FIG. 12

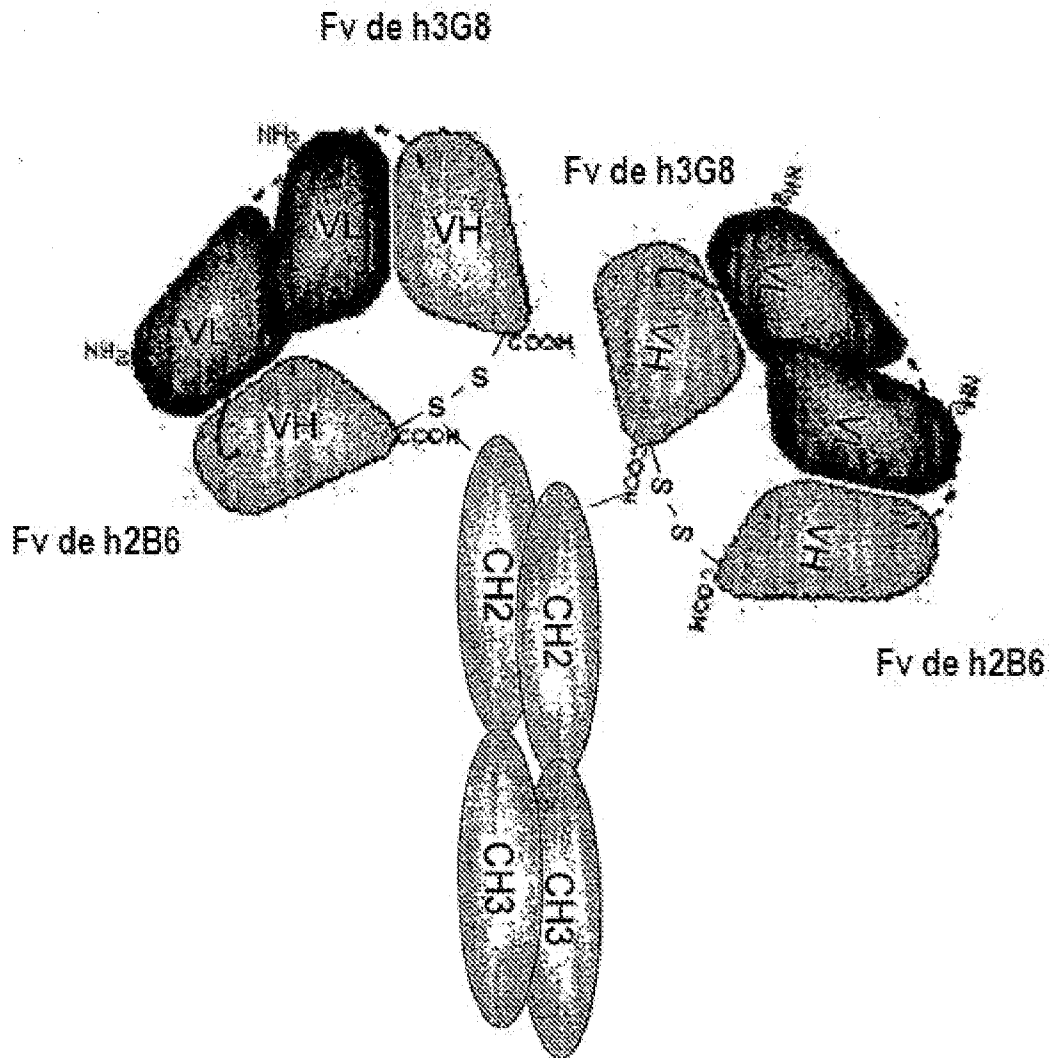


FIG. 13

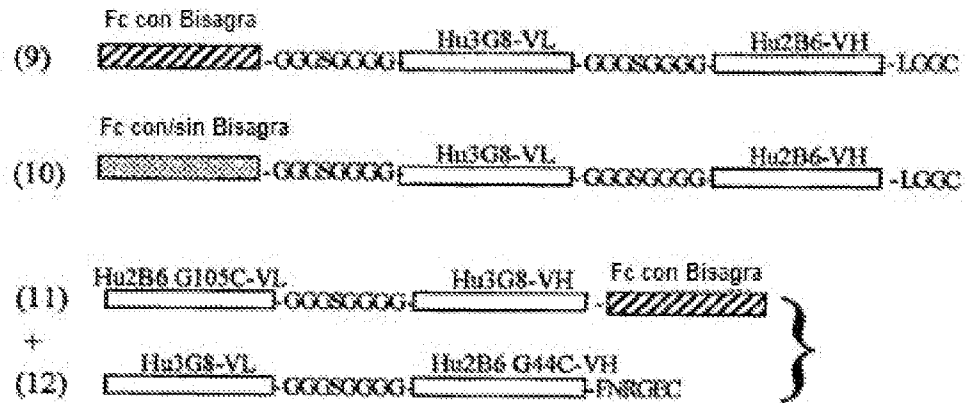


FIG. 14

M 1 2 3

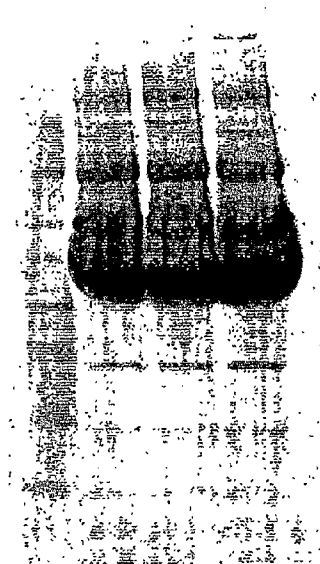


FIG. 15A

3 2 1 M

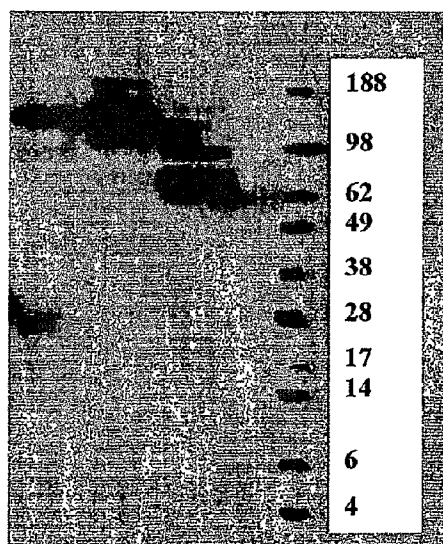


FIG. 15B

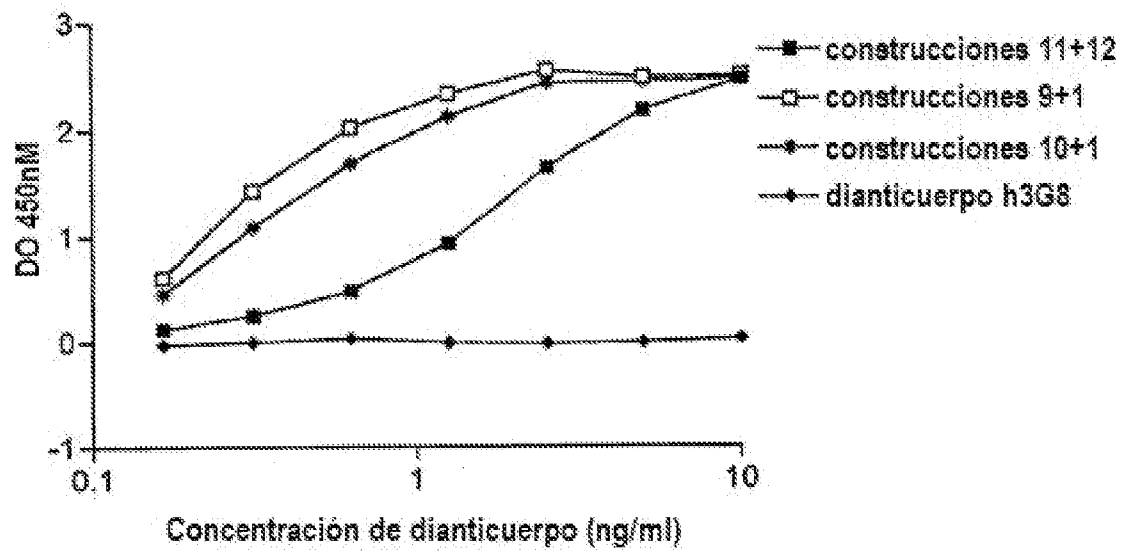


FIG. 16

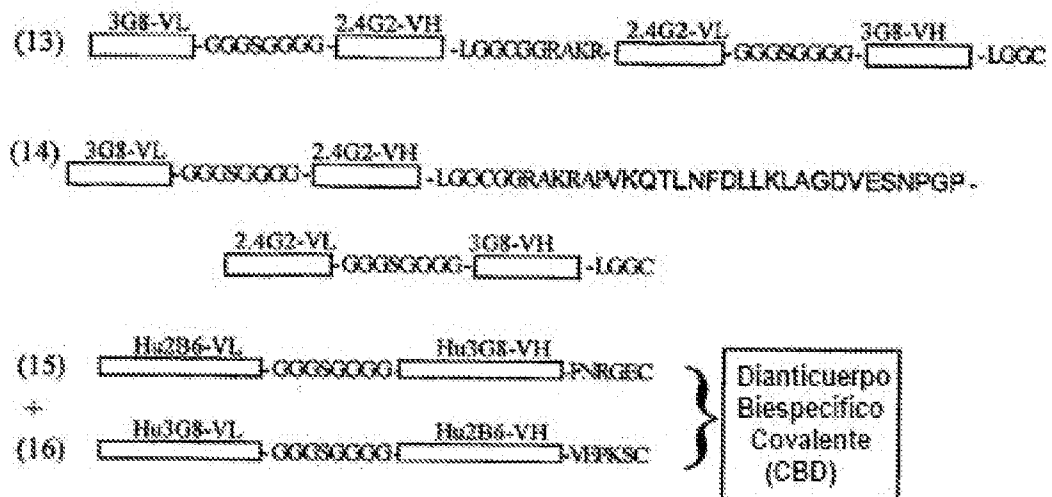


FIG. 17

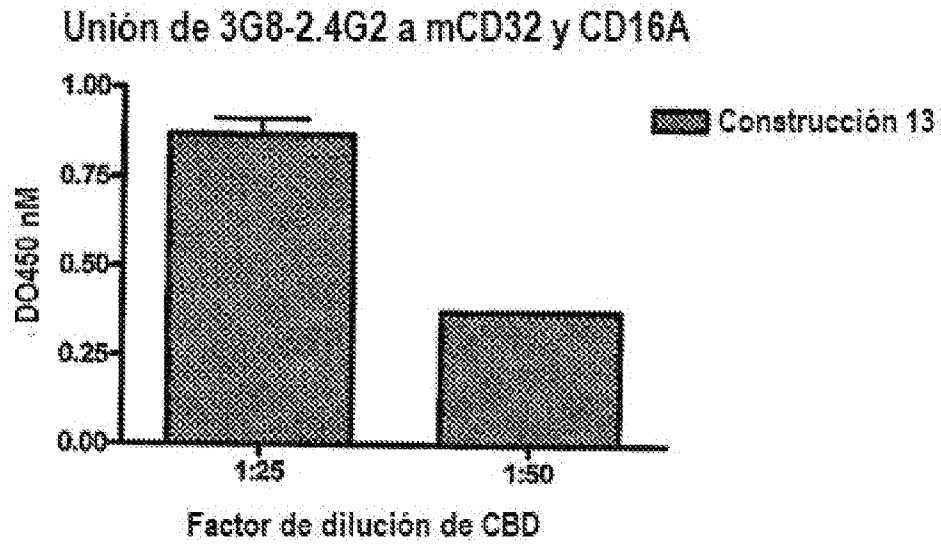


FIG. 18

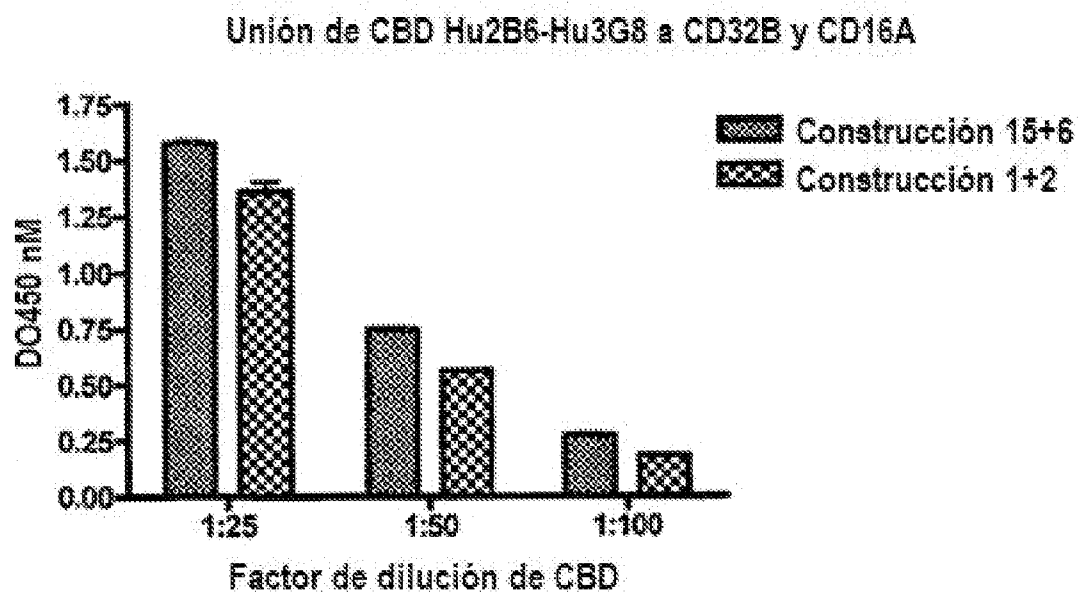


FIG. 19