

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 640**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 10185313 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2380911**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno con afinidad de unión a receptores Fc y función efectora incrementadas**

30 Prioridad:

05.11.2003 US 517096 P

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

15.06.2018

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**UMANA, PABLO;
BRÜNKER, PETER;
FERRARA KOLLER, CLAUDIA;
SUTER, TOBIAS;
PÜNTENER, URSULA y
MÖSSNER, EKKEHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 672 640 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

Moléculas de unión a antígeno con afinidad de unión a receptores Fc y función efectora incrementadas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 La exposición se refiere de manera general a moléculas de unión a antígeno (MUA). En realizaciones particulares, la presente exposición se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Además, la presente exposición se refiere a moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichos MUA y a vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos. La exposición se refiere además a métodos para producir las MUA de la exposición, y a métodos de utilización de los dichos MUA en el tratamiento de enfermedades. Además, la presente exposición se refiere a MUA con glucosilación modificada que presentan propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con una unión a receptores de Fc incrementada y una función efectora incrementada.

15 La invención se define en las reivindicaciones. La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado que comprende:

20 (a) una región variable de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID n° 62, SEC ID n° 64, SEC ID n° 66, SEC ID n° 68, SEC ID n° 70 y SEC ID n° 72, y

(b) la región variable de cadena ligera de KV1 de SEC ID n° 76.

25 Además, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que está codificada por unos ácidos nucleicos que son por lo menos 80% idénticos a SEC ID n° 61, 63, 65, 67, 69 o 71 y una región variable de cadena ligera que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es por lo menos 80% idéntica a la SEC ID n° 75, en el que dicho anticuerpo induce niveles más altos de apoptosis al incubarlo con células humanas positivas para CD20 que un control bajo condiciones idénticas utilizando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con una secuencia idéntica a Rituximab.

30

Antecedentes de la técnicaEl sistema inmunológico y los anticuerpos anti-CD20

35 El sistema inmunológico de los vertebrados, incluido el ser humano, consta de varios órganos y tipos celulares que han evolucionado para reconocer, unirse y destruir los microorganismos foráneos invasores ("antígenos"). Los linfocitos resultan críticos para la función correcta del sistema inmunológico. Estas células se producen en el timo, el bazo y la médula ósea (adulto) y representan aproximadamente 30% de los glóbulos blancos totales presentes en el sistema circulatorio del ser humano adulto. Existen dos subpoblaciones principales de linfocitos: las células T y las células B. Las células T son responsables de la inmunidad mediada por células, mientras que las células B son responsables de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral). Sin embargo, en una respuesta inmunológica típica, las células T y las células B funcionan interdependientemente. Las células T son activadas al unirse el receptor de células T a fragmentos de un antígeno que se encuentran unidos a glucoproteínas del complejo de histocompatibilidad mayor ("CMH") sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos; esta activación provoca la liberación de mediadores biológicos ("interleuquinas"), que estimulan a las células B a diferenciarse y producir anticuerpos ("inmunoglobulinas") contra el antígeno.

40

45

50 Cada célula B dentro del huésped expresa un anticuerpo de un tipo y especificidad particulares, y diferentes células B expresan anticuerpos específicos para diferentes antígenos. La proliferación de las células B y la producción de anticuerpos alcanzan un máximo como reacción a un foráneo antígeno, y típicamente ambos cesan (o se reducen sustancialmente) tras neutralizar el antígeno foráneo. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular puede continuar sin control; dicha proliferación puede resultar en un cáncer denominado "linfoma de células B".

55

Tanto las células T como las células B comprenden proteínas de superficie celular que pueden utilizarse como "marcadores" para la diferenciación e identificación. Una de estas células B humanas marcadoras es el antígeno Bp35 de diferenciación restringida a linfocitos D, denominado "CD20". CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de las células pre-B y permanece hasta la diferenciación de la célula plasmática. Específicamente, la molécula CD20 podría regular una etapa en el proceso de activación que resulta necesaria para el inicio y diferenciación del ciclo celular, y habitualmente se expresa a niveles muy altos en las células B neoplásicas ("tumoraes"). Debido a que CD20 se encuentra presente a niveles elevados sobre células B "malignas", es decir, aquellas células B cuya proliferación no controlada puede conducir a un linfoma de células B, el antígeno de superficie CD20 presenta el potencial de servir como candidato para el "reconocimiento" de los linfomas de células B.

60

65

En esencia, dicho reconocimiento puede generalizarse de la manera siguiente: se introducen anticuerpos específicos del antígeno de superficie CD20 de las células B en un paciente, mediante inyección, por ejemplo. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno de superficie celular CD20 de, aparentemente, células normales y células B malignas; el anticuerpo anti-CD20 unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y marcada reducción de las células B neoplásicas. Además, algunos agentes químicos o marcajes radioactivos que presentan el potencial de destruir el tumor pueden conjugarse con el anticuerpo anti-CD20 de manera que el agente se "administre" específicamente a, por ejemplo, las células B neoplásicas. Con independencia del enfoque, un objetivo principal es destruir el tumor, el enfoque específico puede ser determinado por el anticuerpo anti-CD20 particular que se utilice y, de esta manera, los enfoques disponibles para el reconocimiento del antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) no conjugados pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cáncer, tal como demuestra la autorización de la U.S. Food and Drug Administration del Rituximab (RituxanTM, IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, y Genentech Inc., San Francisco, CA) para el tratamiento de células B CD20-positivas, linfoma no de Hodgkin folicular o de grado bajo, trastuzumab (HerceptinTM, Genentech Inc.), para el tratamiento del cáncer de mama avanzado (Grillo-Lopez, A.-J. et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73, 1999; Goldenberg M.M., *Clin. Ther.* 21:309-18, 1999), Gemtuzumab (MylotargTM, Celltech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en recaída, y Alemtuzumab (CAM-PATHTM, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B. El éxito de estos productos se basa no sólo en su eficacia, sino también en sus excepcionales perfiles de seguridad (Grillo-López A.-J. et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73, 1999; Goldenberg M.M., *Clin. Ther.* 21:309-18, 1999). A pesar de los éxitos obtenidos con estos fármacos, en la actualidad existe un gran interés en obtener una actividad específica más alta de anticuerpo que la proporcionada típicamente por la terapia de mAb no conjugado. El anticuerpo monoclonal murino B-Ly1 es otro anticuerpo que es conocido que es específico del CD20 humano (Poppema S. y Visser L., *Biotest Bulletin* 3: 131-139, 1987). Polyak, M.J. y Deans J.P., *Blood* 99:3256-3262, 2002, describen el anticuerpo B-Ly1 murino como uno de los 16 anticuerpos anti-CD20. Sin embargo, ninguno de los anticuerpos individualmente dado a conocer ha sido caracterizado estructuralmente por completo y ninguno de ellos ha sido dejado en depósito.

Los resultados de varios estudios sugieren que los mecanismos dependientes del receptor Fc contribuyen sustancialmente a la acción de los anticuerpos citotóxicos contra los tumores, e indican que un anticuerpo óptimo contra los tumores se uniría preferentemente a receptores Fc de activación y mínimamente a la pareja inhibidora FcγRIIB (Clynes R. A., et al., *Nature Medicine* 6(4):443-446, 2000; Kalergis A.M. y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195(12):1653-1659, junio de 2002). Por ejemplo, los resultados de por lo menos un estudio sugieren que el receptor FcγRIIIa en particular se encuentra fuertemente asociado a la eficacia de la terapia de anticuerpos (Cartron G. et al., *Blood* 99(3):754-757, febrero de 2002). Este estudio demostró que los pacientes homocigóticos para FcγRIIIa presentaban una mejor respuesta frente al Rituximab que los pacientes heterocigóticos. Los autores concluyeron que la superior respuesta se debía a la mejor unión in vivo del anticuerpo a FcγRIIIA, que resultaba en una mejor actividad de ADCC contra las células de linfoma (Cartron G. et al., *Blood* 99(3):754-757, febrero de 2002).

Se ha informado de diversos intentos de utilizar como diana el antígeno superficial CD20. Se informa de que se administró el anticuerpo monoclonal murino (de ratón) 1F5 (un anticuerpo anti-CD20) mediante infusión intravenosa continua a pacientes de linfoma de células B. Se informa de que resultaron necesarios niveles extremadamente elevados (>2 gramos) de 1F5 para reducir el número de células tumorales circulantes y los resultados se describen como transitorios. Press et al., *Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas*, *Blood* 69/2:584-591, 1987. Un problema potencial de este enfoque es que los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo anticuerpos monoclonales murinos) típicamente no presentan la funcionalidad efectora humana, es decir son incapaces, entre otras cosas, de mediar la lisis dependiente del complemento o de lisar células diana humanas mediante la toxicidad celular dependiente de anticuerpos o de la fagocitosis mediada por el receptor Fc. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como proteína foránea; por lo tanto, las inyecciones repetidas de dichos anticuerpos foráneos podrían conducir a la inducción de respuestas inmunológicas que provocasen reacciones de hipersensibilidad perjudiciales. Para los anticuerpos monoclonales de tipo murino, lo anterior con frecuencia se denomina respuesta de anticuerpos humanos antirratón, o respuesta "HAMA". Además, estos anticuerpos "foráneos" pueden resultar atacados por el sistema inmunológico del huésped de manera que resulten, en efecto, neutralizados antes de alcanzar su sitio diana.

Otro enfoque del que se informa para la mejora de la capacidad de los anticuerpos monoclonales murinos de resultar eficaces en el tratamiento de los trastornos de las células B ha sido conjugar un marcaje radioactivo o una toxina con el anticuerpo, de manera que el marcaje o la toxina se localice en el sitio tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo 1F5 al que se ha hecho referencia anteriormente ha sido "marcado" con yodo-131 (¹³¹I) y se informa de que ha sido evaluado para su biodistribución en dos pacientes (ver Eary J. F. et al., *Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma*, *J. Nuc. Med.* 31(8):1257-1268, 1990; ver también Press O.W. et al., *Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody*, *J. Clin. Onc.* 7(8):1027-1038, 1989) (indicación de que en un paciente tratado con 1F-5 marcado con ¹³¹I se observaba una "respuesta parcial"); Goldenberg D.M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody", *J. Clin. Onc.* 9(4):548-564, 1991 (se informó de que tres de ocho pacientes que habían recibido múltiples inyecciones habían desarrollado una respuesta HAMA); Appelbaum F.R., *Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the*

Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, *Hem./Onc. Clinics of N.A.* 5/5:1013-1025, 1991) (artículo de revisión); Press O. W. et al., Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support, *New England J. Med.* 329/17: 1219-12223 (1993)(anticuerpo IF5 anti-CD20 marcado con yodo-131 y B1) y Kaminski M. G. et al., Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ¹³¹I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody, *New England J. Med.* 329/7, 1993) (anticuerpo B1 anti-CD20 marcado con yodo-131, en lo sucesivo «Kaminski»). También se han conjugado toxinas (es decir, agentes quimioterapéuticos, tales como doxorubicina o mitomicina C) con anticuerpos. Ver, por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicada WO n° 92/07466 (publicada el 14 de mayo de 1992).

Se han desarrollado anticuerpos quiméricos que comprenden partes de anticuerpos de dos o más especies diferentes (por ejemplo ratón y ser humano) como alternativa a los anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, Liu A.Y. et al., Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity", *J. Immun.* 139(10):3521-3526, 1987, describen un anticuerpo quimérico ratón/humano dirigido contra el antígeno CD20. Ver también la publicación de patente PCT WO n° 88/04936. Por ejemplo, el Rituximab (RITUXAN®), un anticuerpo quimérico anti-CD20, ha sido autorizado para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin.

Dada la expresión de CD20 por parte de los linfomas de células B, este antígeno puede servir como candidato para el "reconocimiento" de dichos linfomas. En esencia, dicho reconocimiento puede generalizarse de la manera siguiente: se administran en el paciente anticuerpos específicos para el antígeno de superficie CD20 sobre las células B. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de (aparentemente) tanto células normales como B malignas, y el anticuerpo unido a CD20 sobre la superficie celular resulta en la destrucción y reducción marcada de las células B tumorigénicas. Además, pueden unirse directa o indirectamente agentes quiméricos, citotoxinas o agentes radioactivos al anticuerpo anti-CD20, de manera que el agente sea selectivamente "enviado" a las células B que expresan antígeno CD20. En ambos enfoques el objetivo principal es destruir el tumor. El enfoque específico depende del anticuerpo anti-CD20 particular que se utilice. De esta manera, resulta evidente que los diversos enfoques para el reconocimiento del antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

El anticuerpo de Rituximab (RITUXAN®) es un dominio constante murino gamma-1 humano quimérico manipulado genéticamente que contiene un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD20 humano. Dicho anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma-1 humanos y se identifica mediante el nombre "C2B8" en la patente US n° 5.736.137 (Andersen et. Al.) publicada el 17 de abril de 1998, asignada a IDEC Pharmaceuticals Corporation. El RITUXAN® ha sido autorizado para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin de células B CD20-positivo de grado bajo o folicular en recaída o refractario. Los estudios in vitro de mecanismo de acción han demostrado que el RITUXAN® muestra citotoxicidad dependiente del complemento humano (CDC) (Reff et. al., *Blood* 83(2): 435-445, 1994). Además, muestra una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Se ha demostrado que el RITUXAN® presenta actividad antiproliferativa en ensayos de incorporación de timidina y una capacidad limitada de inducir apoptosis directamente, mientras que los anticuerpos de CD20 no la presentan (Maloney et al., *Blood* 88(10): 637a, 1996).

Glucosilación de anticuerpos

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a propiedades relevantes a la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque de proteasas, las interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas de los oligosacáridos. Pueden realizarse algunas generalizaciones sobre la relación entre la estructura del oligosacárido y la función de la glucoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras oligosacáridas median en la eliminación rápida de la glucoproteína del flujo sanguíneo mediante interacciones con proteínas de unión a carbohidrato específicas, mientras que otras pueden unirse a anticuerpos y desencadenar reacciones inmunológicas no deseadas. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Las células de mamífero son los huéspedes preferentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glucosilar proteínas de la manera más compatible para la aplicación en el ser humano (Cumming et al., *Glycobiology* 1:115-30, 1991); Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996). Las bacterias muy raramente glucosilan las proteínas, y al igual que otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y vegetales, proporcionan patrones de glucosilación asociados a la rápida eliminación del flujo sanguíneo, a interacciones inmunológicas no deseables y en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido las utilizadas más comúnmente durante las últimas dos décadas. Además de proporcionar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clonales altamente productivas y genéticamente estables. Pueden cultivarse a altas densidades en biorreactores simples utilizando medio libre de suero, y permiten el desarrollo de procesos biológicos seguros y reproducibles. Entre otras células animales utilizadas comúnmente se incluyen las células de riñón de hámster neonato (BHK), células de mieloma de ratón NS0 y SP2/0. Más recientemente, también se ha sometido a ensayo la producción de animales transgénicos (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81, 1996).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada, presentando cada isotipo una serie diferente de estructuras de carbohidrato N-ligadas, que afectan variablemente al ensamblaje, secreción o actividad funcional de la proteína (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). La estructura del carbohidrato N-ligado unido varía considerablemente dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos ricos en manosa, de múltiples ramificaciones, así como oligosacáridos complejos biantenarios (Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997). Típicamente se produce un procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacárido nucleares unidas en un sitio de glucosilación particular, de manera que incluso existen anticuerpos monoclonales en forma de glucoformas múltiples. De manera similar, se ha demostrado que se producen diferencias mayores en la glucosilación de los anticuerpos en diferentes líneas celulares, e incluso se observan diferencias menores en una línea celular dada cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo (Lifely M. R. et al., Glycobiology 5(8):813-22, 1995).

Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo simultáneamente un procedimiento de producción simple y evitando potencialmente efectos secundarios no deseables significativos, es incrementar las funciones efectoras naturales mediadas por células de anticuerpos monoclonales mediante la manipulación del componente oligosacárido tal como se describe en Umaña P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999 y en la patente US nº 6.602.684.

Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente utilizados en la inmunoterapia del cáncer, son glucoproteínas que presentan un sitio de glucosilación N-ligada conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos bisectados complejos unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo pueda mediar en las funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M. R., et al., Glycobiology 5:813-822, 1995, Jefferis R., et al., Immunol Rev. 163:59-76, 1998, Wright A. y Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15:26-32, 1997).

Se ha demostrado anteriormente que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de los oligosacáridos bisectados, incrementa significativamente la actividad in vitro de ADCC de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO manipuladas (ver Umaña P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999 y publicación internacional nº WO 99/54342).

El anticuerpo chCE7 pertenece a una clase grande de mAb no conjugados que presentan una afinidad y especificidad para tumores elevadas, pero presentan una potencia excesivamente baja para resultar clínicamente útiles cuando se producen en las líneas celulares industriales estándares que carecen del enzima GnTIII (Umaña P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999). Este estudio fue el primero que demostró que podían obtenerse grandes incrementos de la actividad de ADCC mediante la manipulación de las células productoras de anticuerpos para que expresasen GnTIII, que también condujo a un incremento de la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos no fucosilados bisectados, por encima de los niveles presentes en los anticuerpos naturales.

Sigue existiendo una necesidad de enfoques terapéuticos mejorados con diana en el antígeno CD20 y destinados al tratamiento de los linfomas de células B en primates, incluyendo, aunque sin limitación, el ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Reconociendo el enorme potencial terapéutico de las moléculas de unión a antígeno (MUA) que presentan la especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino y que han sido glucomanipuladas para incrementar la afinidad de unión a receptores Fc y la función efectora, los presentes inventores han desarrollado un método para producir dichas MUA. Este método implica, entre otras cosas, producir anticuerpos quiméricos recombinantes o fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estas MUA se potencia adicionalmente mediante la manipulación del perfil de glucosilación de la región Fc del anticuerpo.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7. (CDR V_{H-1}); (b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23. (CDR V_{H-2}) y SEC ID nº 24. En otro aspecto, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 (CDR V_L). En una realización, cualquiera de dichos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 3. En otro aspecto la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 4. En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID

nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71. En otro aspecto la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 75. En una realización, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos de fusión.

5 La exposición se refiere además a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a la secuencia SEC ID nº 3, en el que el polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a la secuencia SEC ID nº 4, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. La exposición se refiere además a un polinucleótido
10 aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a la secuencia SEC ID nº 75, en el que dicho polinucleótido aislado
15 codifica un polipéptido de fusión.

20 La exposición se refiere además a un polinucleótido que comprende SEC ID nº 11 (cadena pesada completa) o a polinucleótidos que presentan una identidad de 80%, 85%, 90%, 95% o 99% respecto a la SEC ID nº 11. La exposición se refiere además a un polinucleótido que comprende la SEC ID nº 12 (cadena ligera completa) o a polinucleótidos que presentan una identidad de 80%, 85%, 90%, 95% o 99% respecto a la SEC ID nº 12.

25 La exposición se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que presenta la secuencia SEC ID nº 1. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 1, y una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón. La exposición se refiere además a un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido quimérico que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº
30 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42,
35 SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, y una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón.

40 En todavía otro aspecto, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido quimérico que presenta la secuencia SEC ID nº 2. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 2, y una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón. En todavía otro aspecto, se describe un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido quimérico
45 que presenta la secuencia SEC ID nº 76. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76, y una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón.

50 La exposición se refiere además a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la región V_H del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes funcionales del mismo, y una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón. En otro aspecto, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la región V_L del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes funcionales del mismo, y una secuencia codificante de un polipéptido que
55 presenta la secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, procedente de una especie que no es el ratón.

60 La exposición se refiere además a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados que se han indicado anteriormente y a una célula huésped que comprende dicho vector de expresión. En un aspecto adicional, la exposición se refiere a una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados que se han indicado anteriormente.

65 En un aspecto, la exposición se refiere a un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 y SEC ID nº 17. (CDR V_{H-1}); (b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 25, SEC ID nº 26 y SEC ID nº 27 (CDR V_{H-2}) y SEC ID nº

28, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la exposición se refiere a un polipéptido aislado que comprende SEC ID nº 18, SEC ID 19 y SEC ID nº 20. (CDR V_L), en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

5 La exposición se refiere además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEC ID nº 1 o una variante de la misma. La exposición se refiere además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEC ID nº 2 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de dichos polipéptidos comprende además una región Fc humana. La exposición se refiere además a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID
10 nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, o una variante de las mismas. La exposición se refiere además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEC ID nº 76 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de dichos polipéptidos comprende además una región Fc humana.

15 En otro aspecto la exposición se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 murino y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y a una molécula de unión a antígeno que comprende dicho polipéptido. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización preferente, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo
20 humanizado o primatizado.

En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un polipéptido aislado que comprende la SEC ID nº 13 o una variante de la misma. En otro aspecto, la exposición se refiere a un polipéptido aislado que comprende la secuencia
25 SEC ID nº 14.

25 En otro aspecto, la exposición se refiere a una MUA, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 y que es quimérica. En una realización, la MUA es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización adicional, la MUA es un anticuerpo recombinante que comprende una región V_H que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº
30 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72. En otra realización, la MUA es un anticuerpo recombinante que comprende una región V_L que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la secuencia SEC ID nº 2 y SEC ID nº 76. La MUA es un anticuerpo recombinante
35 que se encuentra humanizado. En todavía otra realización, la MUA es un anticuerpo recombinante que ha sido humanizado. En otra realización, la MUA es un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc humana. En una realización adicional, cualquiera de las MUA comentadas anteriormente puede conjugarse con una fracción, tal como una toxina o un marcaje radioactivo.

40 La exposición se refiere además a una MUA tal como se describe en la presente memoria, presentando dicha MUA oligosacáridos modificados. En una realización, los oligosacáridos modificados presentan una fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En una realización adicional, la MUA presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados o de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicha molécula. En una realización,
45 los oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos. En una realización adicional, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos. En una realización, por lo menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados o bisectados. En realizaciones más preferentes, por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% o más de los oligosacáridos son no fucosilados o no fucosilados bisectados.

50 La exposición se refiere además a un polinucleótido codificante de cualquiera de las MUA comentadas anteriormente, y vectores de expresión y células que comprenden dicho polinucleótido.

55 La exposición se refiere además a un método para producir una MUA, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 y en el que dicha MUA es quimérica, comprendiendo dicho método: (a) cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una MUA de la presente invención en un medio bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido codificante de dicha MUA, y (b) recuperar dicha MUA a partir del cultivo resultante.

60 En otro aspecto, la exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende la MUA descrita en la presente memoria. Se encuentra contemplado que la composición farmacéutica pueda comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, un adyuvante o una combinación de los mismos.

65 En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un método para tratar una enfermedad tratable mediante la reducción marcada de las células B. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las MUA de la presente invención en un sujeto humano que lo necesita. En una realización preferente, la enfermedad se

trata mediante la administración de una MUA que es un anticuerpo quimérico o un fragmento quimérico de un anticuerpo.

5 En todavía otro aspecto, la exposición se refiere a una célula huésped manipulada para que exprese por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de los anticuerpos producidos por la célula huésped, en la que las MUA son capaces de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 y en la que las MUA son quiméricas. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión. En otra realización, la MUA producida por la célula huésped es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización adicional, la MUA comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

15 La exposición se refiere además a un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferentemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos residuos determinantes de especificidad de cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (por ejemplo humanizado). La exposición se refiere además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

25 En otra realización, la exposición se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha región determinante de complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, por ejemplo humanizado. La exposición se refiere además a métodos de preparación de dichas moléculas ligantes de antígeno y a la utilización de las mismas en el tratamiento de enfermedades, incluyendo los linfomas de las células B.

35 La presente exposición es el primer caso conocido de manipulación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para que presente funciones efectoras incrementadas, tales como la ADCC, conservando simultáneamente una potente capacidad de apoptosis. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente exposición se refiere a un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado que presenta una ADCC incrementada como resultado de dicha manipulación y sin pérdida sustancial de capacidad de inducción de apoptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II han sido manipulados para presentar un patrón alterado de glucosilación en la región Fc. En una realización particular, la glucosilación alterada comprende un nivel incrementado de residuos complejos bisectados en la región Fc. En otra realización particular, la glucosilación alterada comprende un número reducido de residuos fucosa en la región Fc. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II han sido sometidos a manipulación del polipéptido. La exposición se refiere asimismo a métodos de preparación de dichos anticuerpos de tipo II manipulados y a métodos de utilización de dichos anticuerpos en el tratamiento de diversos trastornos de las células B, incluyendo los linfomas de células B.

50 La célula huésped de la presente invención puede seleccionarse de entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PERC6 o una célula de hibridoma. En una realización, la célula huésped de la exposición comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido codificante de la región V_L del anticuerpo B-Ly1 murino o variantes del mismo y una secuencia codificante de una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización, la célula huésped de la exposición comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido codificante de la región V_H del anticuerpo B-Ly1 murino o variantes del mismo y una secuencia codificante de una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

60 En un aspecto adicional, la exposición se refiere a una célula huésped que produce una MUA que muestra una afinidad de unión a receptores Fc incrementada y/o una función efectora incrementada como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de unión incrementada es a un receptor Fc, particularmente al receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada en la presente invención puede seleccionarse de entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a células polimorfonucleares, unión incrementada a monocitos, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y cebado incrementado de las células T.

En una realización adicional, la célula huésped tal como se describe en la presente memoria comprende por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII que se encuentra operablemente ligado a un elemento promotor constitutivo.

5 En otro aspecto, la exposición se refiere a un método para producir una MUA en una célula huésped, que comprende: (a) cultivar una célula huésped manipulada para expresar por lo menos un polinucleótido codificante de un polipéptido de fusión que presente actividad de GnTIII bajo condiciones que permitan la producción de dicha MUA y que permitan la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha MUA, y (b) aislar dicha MUA, en donde dicha MUA es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20, y en donde dicha MUA es quimérica. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión, que preferentemente comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en el Golgi de un polipéptido residente en el Golgi heterólogo seleccionado de entre el grupo que consiste del dominio de localización de la manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII") y el dominio de localización de α 1-6-fucosiltransferasa nuclear. Preferentemente, el dominio de localización en el Golgi es de la manosidasa II o de GnTI.

En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un método para modificar el perfil de glucosilación de una MUA anti-CD20 producida por una célula huésped, que comprende introducir en la célula huésped por lo menos un ácido nucleico o vector de expresión de la invención. En una realización, la MUA es un anticuerpo o un fragmento del mismo, comprendiendo preferentemente la región Fc de una IgG. Alternativamente, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a una región Fc de una IgG humana.

En un aspecto, la exposición se refiere a un anticuerpo quimérico recombinante, o a un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 y que presenta una fucosilación reducida.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a un método para modificar la glucosilación del anticuerpo recombinante o de un fragmento del mismo de la invención mediante la utilización de un polipéptido de fusión que presenta actividad de GnTIII y que comprende el dominio de localización de Golgi de un polipéptido residente en el Golgi heterólogo. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de GnTIII. En otra realización, el dominio de localización en el Golgi se selecciona de entre el grupo que consiste en el dominio de localización de la manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de la manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de la α 1-6-fucosiltransferasa nuclear. Preferentemente, el dominio de localización en el Golgi es de la manosidasa II o de GnTI.

En una realización, el método descrito en la presente memoria se refiere a producir un anticuerpo quimérico recombinante, o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados, en el que dichos oligosacáridos modificados presentan una fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. Según la presente exposición, estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o complejos. En otra realización, el método de la invención se refiere a la producción de un anticuerpo quimérico recombinante o un fragmento del mismo que presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos. En una realización adicional, el método de la invención se refiere a producir un anticuerpo quimérico recombinante o un fragmento del mismo en el que por lo menos 20% de los oligosacáridos de la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados. En otra realización preferente, por lo menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados. En otra realización preferente, en la que por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un anticuerpo quimérico recombinante o a un fragmento del mismo, que muestra una afinidad de unión de receptor Fc incrementada y/o una función efectora incrementada como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de unión incrementada es a un receptor activador de Fc. En una realización adicional, el receptor Fc es un receptor activador Fc γ , particularmente el receptor Fc γ RIII. La función efectora contemplada en la presente invención puede seleccionarse de entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a células polimorfonucleares, unión incrementada a monocitos, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y cebado incrementado de las células T.

En otro aspecto, la exposición se refiere a un fragmento de anticuerpo quimérico recombinante que presenta la especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino y que contiene la región Fc, que ha sido manipulado para presentar una función efectora incrementada producido mediante cualquiera de los métodos de la presente invención.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 1 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para

presentar una función efectora incrementada producida mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

5 En otro aspecto, se da a conocer una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 2 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para presentar una función efectora incrementada producida mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

10 En un aspecto, la presente exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico recombinante, producido mediante cualquiera de los métodos de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo quimérico recombinante producido mediante cualquiera de los métodos de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión producida mediante cualquiera de los métodos de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15 La exposición se refiere además a un método de tratamiento de una enfermedad tratable mediante la reducción marcada de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo quimérico recombinante o de un fragmento del mismo, producido mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, en un sujeto humano que lo necesita.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1. Secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 3) y de aminoácidos (SEC ID nº 1) de la región V_H de B-Ly1 murino.
 FIG 2. Secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 4) y de aminoácidos (SEC ID nº 3) de la región V_L de B-Ly1 murino.
 25 FIG 3. Unión de Rituximab® y de ch-B_Ly1 (Δ) a CD20 sobre células B de linfoma de Raji.
 FIG 4. Reducción marcada de las células B por Rituximab® (O) y ch-B_Ly1 (Δ) en sangre completa de tres clases diferentes de genotipo FcyRIIIa-158V/F: (A) sangre completa de un donante F/F, homocigótico para el receptor de menor afinidad, (B) sangre completa de un donante F/V, heterocigótico para el receptor de afinidad, y (C) sangre completa de un donante V/V, homocigótico para el receptor de afinidad más alta.
 30 FIG 5. Secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 11) y de aminoácidos (SEC ID nº 13) de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.
 FIG 6. Secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 12) y de aminoácidos (SEC ID nº 14) de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.
 FIG 7. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las CDR del anticuerpo B-Ly1 murino. (A) CDR predichas para la región V_H. (B) CDR predichas para la región V_L.
 35 FIG 8. Perfil de MALDI-TOF de un anticuerpo B-Ly1 quimérico glucomanipulado. (A) Tabla que muestra los porcentajes de picos específicos, (B) espectro de B-Ly1 quimérico glucomanipulado, (C) espectro de B-Ly1 quimérico glucomanipulado tratado con Endo-H.
 FIG 9. Unión de diferentes anticuerpos anti-CD20 humanizados a células B Raji. Las diferencias entre el constructo B-HH2 y los constructos B-HL8 y B-HL1 se localizan en las regiones de marco 1 y 2, siendo las tres CDR idénticas. B-HL8 y B-HL11 derivan sus secuencias de FR1 y FR2 de la clase VH3 humana, mientras que el marco B-HH2 completo se deriva de VH1 humano. β-HL11 es un derivado de B-HL8 con la mutación única Glu1Gln, en la que Gln es el residuo aminoácido en el constructo B-HH2. Lo anterior significa que el intercambio Glu-Gln no altera la afinidad o la intensidad de la unión. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son: 14
 40 45 residuos de FR, de entre los que uno o más influirá sobre el comportamiento de unión a antígeno de este anticuerpo.
 FIG 10. Unión del anticuerpo anti-CD20 humanizado BHL4-KV a células diana Raji. El constructo B-HL4 se derivada del anticuerpo B-HH2 mediante la sustitución del FR1 de B-HH2 por el de la secuencia VH1_45 de la línea germinal humana. Este constructo muestra una capacidad de unión a antígeno muy reducida, a pesar de presentar aminoácidos diferentes únicamente en tres posiciones en FR1. Estos residuos se encuentran situados en las posiciones 2, 14 y 30 según la numeración de Kabat. De estos, la posición 30 aparentemente es la posición con más influencia, debido a que es parte de la definición de Chothia de la CDR1.
 50 FIG 11. Comparación entre el comportamiento de unión de B-HH1, B-HH2 y B-HH3 y el anticuerpo parental B-ly1. Los datos muestran que todos los anticuerpos muestran un valor de EC50 similar, aunque el constructo B-HH1 se une con una intensidad/estequiometría menor que las variantes B-HH2 y B-HH3. B-HH1 puede distinguirse de B-HH2 y de B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición de Kabat), así como el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración de Kabat). Esto indica que la posición 28, la CDR1 completa y/o la CDR2 completa resultan importantes para la interacción anticuerpo/antígeno.
 55 FIG 12. Comparación entre B-HH, B-HH1 y el anticuerpo parental B-ly1. Los datos mostraron la ausencia de cualquier actividad de unión en el constructo B-HL1, y aproximadamente la mitad de la intensidad/estequiometría de unión de B-HH1 que B-ly1. Tanto B-HL1 como B-HH1 han sido diseñados basándose en marcos aceptores derivados de la clase VH-1 humana. Entre otras diferencias, la posición 71 (numeración de Kabat) del constructo B-HL1 es una diferencia notable, que indica su importancia putativa para la unión de antígeno.
 60 FIG 13. Análisis fluorocitométrico de la capacidad del anticuerpo anti-CD20 de unión a su antígeno. Los datos mostraron que los constructos B-HL2 y B-HL3 no presentaban actividad de unión a CD-20.
 65 FIG 14. Apoptosis de los anticuerpos anti-CD20 en células Z-138 MCL.

FIG 15. Apoptosis por anticuerpos anti-CD20. Datos del ensayo: se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/ml) en medio de cultivo. Se añadieron a los pocillos 10 mg del anticuerpo respectivo, PBS como control negativo o camptotecina (CPT) 5 mM como control positivo. Las muestras se incubaron durante la noche (16 horas), se tiñeron con AnnV-FITC y se analizaron mediante FACS. El ensayo se realizó por triplicado. (*): Se ha restado la señal de PBS solo (PBS solo proporcionó una señal de 8% y 2%, AnnV+, para las células PR-1 y Z-138, respectivamente). Los anticuerpos utilizados fueron: C2B8 (quimérico, no glucomanipulado), BHH2-KV1 (humanizado, no glucomanipulado). Nota: este ensayo no implica la adición de células efectoras adicionales, únicamente dianas más anticuerpo o controles.

FIG 16. Eliminación de células diana por parte de anticuerpos anti-CD20 con células inmunológicas efectoras. Datos del ensayo: reducción del número de células B durante la incubación durante la noche de sangre completa normal y análisis para $CD19^+/CD3^+$ mediante FACS. ADCC utilizando CMSP como efectoras, 4 h de incubación, proporción de efectoras:diana de 25:1, eliminación de la diana medida a partir de la retención de calceína respecto a la lisis con detergente (100%) y a la lisis sin anticuerpo (0%). Anticuerpos utilizados: C2B8 (quimérico, forma no glucomanipulada), BHH2-KV1-wt (forma humanizada no glucomanipulada de BHH2-KV1), BHH2-KV1-GE (forma humanizada no glucomanipulada de BHH2-KV1).

FIG 17. Perfil de EM-MALDI/TOF de Fc-oligosacáridos liberados con PNGasa F de anticuerpo IgG1 B-ly1 anti-CD20 humano no modificado no glucomanipulado humanizado con BHH2-KV1.

FIG 18. Perfil de EM-MALDI/TOF de Fc-oligosacáridos liberados con PNGasaF de anticuerpo IgG1 B-ly1 anti-CD20 humano glucomanipulado humanizado con BHH2-KV1g1. La glucomanipulación se realizó mediante coexpresión en células huésped de genes de anticuerpo y del gen codificante de enzima con actividad catalítica de β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (Gnt-III).

FIG 19. Perfil de EM-MALDI/TOF de Fc-oligosacáridos liberados con PNGasaF de anticuerpo IgG1 B-ly1 anti-CD20 humano glucomanipulado humanizado con BHH2-KV1g2. La glucomanipulación se realizó mediante coexpresión en células huésped de genes de anticuerpo y genes codificantes de enzima con actividad catalítica de β -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III) y codificante de enzima con actividad catalítica de α -manosidasa II del Golgi.

FIG 20. Unión de anticuerpos no glucomanipulados y glucomanipulados a receptor Fc γ RIIIa expresado sobre la superficie de células CHO-CD16 recombinantes.

FIG 21. Apoptosis de anticuerpos anti-CD20 no manipulados con Fc y manipulados con Fc sobre células Z-138 MCL. Datos del ensayo: se sembraron 5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos (5×10^5 células/ml) en medio de cultivo. Se añadieron a los pocillos 10 mg del Ab respectivo, PBS para el control negativo. Las muestras se incubaron durante la noche (16 horas), se tiñeron con AnnV-FITC y se analizaron mediante FACS. El ensayo se realizó por triplicado. Anticuerpos utilizados: C2B8=Rituximab (forma no glucomanipulada quimérica, igual a la forma comercial), BHH2-KV1 (forma no glucomanipulada humanizada, ver la fig. 6 para el perfil de glucosilación), BHH2-KV1g1 (forma glucomanipulada humanizada, ver la figura 7 para el perfil de glucosilación), BHH2-KV1g2 (forma glucomanipulada humanizada, ver la fig. 8 para el perfil de glucosilación) Nota: este ensayo no implica la adición de células efectoras adicionales, únicamente dianas más anticuerpo o controles. (*): se ha restado la señal de PBS solo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos se utilizan en la presente memoria tal como se utilizan generalmente en la técnica, a menos que se definan de otra manera a continuación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" pretende incluir moléculas de anticuerpo completo, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que presentan la región Fc y que conservan la especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que conservan la especificidad de unión. También se encuentran comprendidos los anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región Fc" pretende referirse a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde el residuo aminoácido en la posición Cys226 hasta el extremo carboxilo-terminal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" pretende incluir las variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina, así como las variantes que presentan alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones pero que no reducen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina de mediar en funciones efectoras (tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Por ejemplo, puede deleccionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse según reglas generales conocidas de la técnica, de manera que presente un efecto mínimo sobre la actividad (ver, por ejemplo, Bowie J. U. et al., Science 247: 1306-10, 1990).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de unión a antígeno" se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Más específicamente, una

"molécula de unión a antígeno que se une a CD20" es una molécula que se une específicamente a una fosfoproteína no glucosilada de superficie celular de 35.000 daltons, denominada típicamente antígeno Bp35 de diferenciación restringida de los linfocitos B humanos, denominado comúnmente CD20. La expresión "se une específicamente" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede diferenciarse de interacciones no deseadas o no específicas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "fusión" y "quimérico", cuando se utilizan en referencia a polipéptidos tales como las MUA, se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más polipéptidos heterólogos, tales como partes de anticuerpos de diferentes especies. Para las MUA quiméricas, por ejemplo, los componentes no ligantes de antígeno pueden derivarse de una amplia diversidad de especies, incluyendo primates, tales como los chimpancés y los seres humanos. La región constante de la MUA quimérica más preferentemente es sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico más preferentemente es sustancialmente idéntica a la de un anticuerpo anti-CD20 recombinante que presenta la secuencia de aminoácidos de la región variable B-Ly1 murina. Los anticuerpos humanizados resultan ser una forma particularmente preferente de anticuerpo de fusión o quimérico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido que presenta actividad de GnTIII" se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo N-acetilglucosamina (GlcNAc) en enlace β -1-4 con el manósido β -ligado del núcleo trimanosilo de los oligosacáridos N-ligados. Lo anterior incluye los polipéptidos de fusión que muestran una actividad enzimática similar, aunque no necesariamente idéntica, a una actividad de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosilglucoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), según el comité de nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), según medición en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en exista dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la de GnTIII, sino sustancialmente similar a la dependencia de dosis para una actividad dada en comparación con la de GnTIII (es decir, el polipéptido candidato muestra una actividad mayor o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad, y más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad que GnTIII).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "variante" (o "análogo") se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido específicamente indicado de la invención por inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos, creadas utilizando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante. Entre las variantes de las MUA de la presente invención se incluyen moléculas ligantes de antígeno quiméricas, primatizadas o humanizadas en las que uno o varios de los residuos aminoácidos se modifican mediante sustitución, adición y/o deleción de manera que no afecten sustancialmente a la afinidad de unión a antígeno (por ejemplo a CD20). Pueden encontrarse una orientación para determinar qué residuos aminoácidos pueden sustituirse, añadirse o deleccionarse sin eliminar actividades de interés, comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de elevada homología (regiones conservadas) o sustituyendo aminoácidos por una secuencia de consenso.

Alternativamente, pueden sintetizarse variantes recombinantes codificantes dichos polipéptidos o polipéptidos similares o seleccionarse utilizando la "redundancia" del código genético. Pueden introducirse diversas sustituciones de codones, tales como los cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, con el fin de optimizar la clonación en un plásmido o vector vírico o la expresión en un sistema procariótico o eucariótico particular. Las mutaciones en la secuencia polinucleótido pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para modificar características tales como las afinidades de unión de ligando, las afinidades entre cadenas o la tasa de degradación/renovación.

Preferentemente, las "sustituciones" de aminoácidos son el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que presenta propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos. Pueden realizarse dichas sustituciones de aminoácidos "conservadoras" basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) se incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; entre los aminoácidos neutros polares se incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; entre los aminoácidos cargados positivamente (básicos) se incluyen arginina, lisina e histidina, y entre los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Las "inserciones" o "deleciones" preferentemente son de entre aproximadamente 1 y 20 aminoácidos, preferentemente de entre 1 y 10 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido utilizando técnicas de ADN recombinante y sometiendo a ensayo las variantes recombinantes resultantes para la actividad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "humanizado" se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no humana, por ejemplo un anticuerpo murino, que conserva o que conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénica en el ser humano. Esto puede conseguirse mediante diversos métodos, incluyendo: (a) la

inertación de los dominios variables no humanos enteros en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar únicamente las CDR no humanas en las regiones de marco y constantes humanas con o sin conservación de los residuos de marco críticos (por ejemplo aquellos que resultan importantes para conservar una buena afinidad de unión de antígeno o funciones de anticuerpo), o (c) trasplantar los dominios variables no humanos enteros aunque "cubriéndolos" con una sección de tipo humano mediante sustitución de los residuos superficiales. Dichos métodos se dan a conocer en Jones et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991 y Padlan, Molec. Immun. 31(3):169-217, 1994.

Existen generalmente 3 regiones determinantes de complementariedad, o CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo, que se encuentran flanqueados por cuatro subregiones de marco (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Puede encontrarse un comentario sobre los anticuerpos humanizados en, entre otros, la patente US nº 6.632.927 y publicado en la solicitud de patente US nº 2003/0175269.

De manera similar, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "primatizado" se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no de primate, por ejemplo un anticuerpo murino, que conserva o que conserva sustancialmente las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénica en primates.

En el caso de que existan dos o más definiciones de una expresión que se utilicen y/o se encuentren aceptadas en la técnica, la definición del término utilizada en la presente memoria pretenderá incluir la totalidad de dichos significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es la utilización de la expresión "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de unión a antígeno no contiguos presentes dentro de la región variable de los polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. Dicha región particular ha sido descrita por Kabat et al. (U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983) y por Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987), en donde las definiciones incluyen residuos solapantes o subgrupos de residuos aminoácidos al compararlos entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de la misma pretende encontrarse comprendida dentro del alcance de la expresión según se define y se utiliza en la presente memoria. Los residuos aminoácidos apropiados que comprenden las CDR tal como se definen en cada una de las referencias citadas se proporcionan a continuación, en la Tabla 1, a modo comparativo. El número exacto de residuos que comprende una CDR particular varía dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. El experto en la materia podrá determinar rutinariamente qué residuos se encuentran comprendidos en una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia	MUA
CDR1 de V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 de V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 de V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 de V _L	24-34	26-32	
CDR2 de V _L	50-56	50-52	
CDR3 de V _L	89-97	91-96	

¹La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 sigue las convenciones de numeración proporcionadas por Kabat et al. (ver posteriormente)

Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para las secuencias de dominio variable que resulta aplicable a cualquier anticuerpo. El experto ordinario en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable sin basarse en ningún dato experimental más allá de la secuencia misma. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión «numeración de Kabat» se refiere al sistema de numeración proporcionado en Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1993). A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuo aminoácido en una MUA se realizan según el sistema de numeración Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, SEC ID nº 1 a SEC ID nº 78) no han sido numeradas según el sistema de numeración Kabat.

La mención de un ácido nucleico o polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente exposición pretende hacer referencia a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto en que la secuencia polinucleótida puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que presente una secuencia de nucleótidos por lo menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden delecionarse o sustituirse por otro nucleótido, o puede insertarse

en la secuencia de referencia un número de nucleótidos de hasta 5% del total de nucleótidos de la secuencia de referencia. La secuencia de pregunta puede ser la secuencia entera mostrada en la fig. 24 o en la fig. 25.

5 En la práctica, puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos si cualquier molécula de ácidos nucleicos o polipéptido particular es idéntica por lo menos al 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una secuencia de nucleótidos o a una secuencia polipeptídica de la presente exposición. Un método preferente para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineación global de secuencias, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB, basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990. En una alineación de secuencias, las secuencias de pregunta y sujeto son secuencias de ADN. Puede compararse una secuencia de ARN convirtiendo los Us en Ts. El resultado de dicha alineación global de secuencias se proporciona en forma de porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuplo=4, Penalización por desapareamiento=1, Penalización por unión=30, Longitud de grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalización por hueco=5, Penalización según tamaño del hueco=0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, la que sea más corta.

20 En el caso de que la secuencia objeto sea más corta que la secuencia de pregunta debido a deleciones 5' ó 3', no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no considera los truncados 5' y 3' de la secuencia sujeto al calcular el porcentaje de identidad. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' o 3', respecto a la secuencia pregunta, se corrige el porcentaje de identidad mediante el cálculo del número de bases de la secuencia pregunta que se encuentran situados 5' y 3' respecto de la secuencia sujeto, que no se encuentran apareados/alineados, como porcentaje del número total de bases de la secuencia pregunta. Si un nucleótido es correspondiente/ha sido alineado se determina a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, dicho porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anteriormente indicado utilizando los parámetros especificados, a fin de llegar a una puntuación final de porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida es la que se utiliza para los fines de la presente invención. Sólo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, tal como es mostrada por la alineación de FASTDB, que no son correspondientes/no se encuentran alineadas con la secuencia de pregunta, se calculan para los fines de ajuste manual de la puntuación de porcentaje de identidad.

35 Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 bases con una secuencia de pregunta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones ocurren en el extremo 5' de la secuencia sujeto y, por lo tanto, la alineación de FASTDB no muestra una correspondencia/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no correspondientes/número total de bases en la secuencia de pregunta) de manera que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. En el caso de que las 90 bases fueran perfectamente correspondientes, el porcentaje final de identidad sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de pregunta de 100 bases. En esta ocasión, las deleciones eran deleciones internas de manera que no hay bases en el lado 5' o 3' de la secuencia sujeto que no son correspondientes/no están alineadas con la secuencia de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no es corregido manualmente. Nuevamente, sólo las bases en el lado 5' y 3' de la secuencia sujeto que no son correspondientes/no se encuentran alineadas con la secuencia de pregunta son corregidas manualmente. No resulta necesario realizar otras correcciones manuales para los fines de la presente exposición.

45 Por un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos por lo menos, por ejemplo, 95% "idénticas" a una secuencia de aminoácidos problema descrita en la presente memoria pretende hacerse referencia a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es idéntica a la secuencia problema, excepto en que la secuencia del polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de pregunta. En otras palabras, con el fin de obtener un polipéptido que presente una secuencia de aminoácidos idéntica por lo menos al 95% a una secuencia de aminoácidos problema, hasta 5% de los residuos aminoácidos en la secuencia problema pueden insertarse, deleccionarse o sustituirse por otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre dichas posiciones terminales, dispersas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

60 Como cuestión práctica, si cualquier polipéptido particular es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de referencia puede determinarse convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferente para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también denominado alineación global de secuencias, puede determinarse utilizando el programa informático FASTDB, basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990. En una alineación de secuencias, las secuencias de pregunta y sujeto son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación global de secuencias se proporciona en forma de porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes que se utilizan en una alineación de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, penalización de no

correspondencia=1, penalización de unión=20, longitud del grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, tamaño de ventana=longitud de secuencia, penalización de hueco=5, penalización de tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 ó la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, la más corta de entre los dos valores

5 En el caso de que la secuencia de la invención sea más corta que la secuencia de pregunta debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual de los resultados. Lo anterior se debe a que el programa FASTDB no incluye truncados N- y C-terminales de la secuencia de la invención al calcular el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos N- y C-terminal, respecto a la secuencia de pregunta, el porcentaje de identidad se corrige mediante el cálculo del número de
10 residuos de la secuencia de pregunta que se encuentran en posición N- y C-terminal respecto a la secuencia objeto, que no son correspondientes/desalineadas con un residuo objeto correspondiente, como porcentaje del número total de bases de la secuencia de pregunta. Se determina si un nucleótido es correspondiente/alineado a partir de los resultados de la alineación de secuencias de FASTDB. A continuación, dicho porcentaje se resta del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anteriormente indicado utilizando los parámetros especificados, a fin de llegar a una puntuación final de porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida es la utilizada para los fines de la presente invención. Únicamente las bases más allá de los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia sujeto, que son no correspondientes/desalineadas respecto a la secuencia de pregunta, se consideran para los fines de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, sólo las posiciones de residuo de pregunta más allá de los residuos N-terminales y C-terminales más alejados de la secuencia sujeto.

20 Por ejemplo, se alinea una secuencia sujeto de 90 aminoácidos con una secuencia de pregunta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N-terminal de la secuencia sujeto y, por lo tanto, la alineación de FASTD no muestra una correspondencia/alineación de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Las 10 bases no apareadas representan 10% de la secuencia (número de bases en los
25 extremos N-terminal y C-terminal no correspondientes/número total de bases de la secuencia de pregunta), de manera que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. En el caso de que los 90 residuos fueran perfectamente correspondientes, el porcentaje final de identidad sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia de pregunta de 100 residuos. En este caso las deleciones son deleciones internas, de manera que no hay residuos en los extremos N-terminal o C-terminal de la secuencia sujeto que no sean correspondientes/alineadas con la secuencia de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no es corregido manualmente. Nuevamente, únicamente las posiciones de residuos en los extremos N-terminal y C-terminal de la secuencia sujeto, tal como se muestran en la alineación de FASTDB, que no son correspondientes/alineadas con la secuencia de pregunta se corrigen manualmente. No debe realizarse ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico que "se hibrida bajo condiciones restrictivas" a una secuencia de ácidos nucleicos de la invención se refiere a un polinucleótido que se hibrida en una incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 10% y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio de localización en el Golgi" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en el Golgi que es responsable del anclaje del polipéptido en una localización dentro del complejo de Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden "colas" amino-terminales de un enzima.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "función efectora" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitación, afinidad de unión a receptores Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citoquinas, incorporación de antígenos mediada por complejo inmunológico por células presentadoras de antígeno, regulación negativa de receptores de superficie celular, etc.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "manipular", "manipulado", "manipulación" y "manipulación mediante glucosilación" se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glucosilación de un polipéptido o fragmento de polipéptido natural o recombinante. La manipulación mediante glucosilación incluye la manipulación metabólica de la maquinaria de glucosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para conseguir una glucosilación alterada de las glucoproteínas expresadas en las células. Además, la manipulación mediante glucosilación incluye los efectos de mutaciones y del medio celular sobre la glucosilación.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula huésped" comprende cualquier tipo de sistema celular que pueda manipularse para generar los polipéptidos y moléculas de unión a antígeno de la presente invención. En una realización, la célula huésped se manipula para producir la producción de una molécula de unión a antígeno con glucoformas modificadas. En una realización preferente, la molécula de unión a antígeno es un

anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión. En determinadas realizaciones, las células huésped han sido manipuladas adicionalmente para expresar niveles incrementados de uno o más polipéptidos que presentan actividad GnTIII. Entre las células huésped se incluyen células en cultivo, por ejemplo células de mamífero en cultivo, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, entre otros, aunque también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido vegetal o animal en cultivo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "citotoxicidad celular mediada por Fc" incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión a Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmunológico que conduce a la lisis de "células diana de anticuerpo" por "células efectoras inmunológicas humanas", en el que:

Las "células efectoras inmunológicas humanas" se refiere a una población de leucocitos que expresan receptores de Fc sobre la superficie, mediante la que se unen a la región Fc de los anticuerpos o de las proteínas de fusión de Fc y llevan a cabo funciones efectoras. Dicha población puede incluir, aunque sin limitarse a ellas, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y/o células asesinas naturales (NK).

Las "células reconocidas por anticuerpos" son células a las que se unen anticuerpos o proteínas de fusión con Fc. Los anticuerpos o proteínas de fusión con Fc se unen a las células diana mediante la parte de la proteína N-terminal respecto a la región Fc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada" se define como un incremento del número de "células reconocidas por anticuerpos" que resultan lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo, o de proteínas de fusión con Fc, en el medio circundante a las células diana, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc definido anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo o de proteína de fusión con Fc, en el medio circundante a las células diana, necesario para conseguir la lisis de un número dado de "células reconocidas por anticuerpos", en un tiempo dado, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediada por Fc. El incremento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es respecto a la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo, o proteína de fusión con Fc, producido por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que son conocidos por el experto en la materia, pero que no ha sido producido por células huésped manipuladas para expresar la glucosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos en la presente memoria.

La expresión "anticuerpo que presentan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a un anticuerpo, tal como se define dicha expresión en la presente memoria, que presenta una ADCC incrementada según se determina mediante cualquier método adecuado conocido por el experto ordinario en la materia. Un ensayo ADCC in vitro aceptado es el siguiente:

- 1) el ensayo utiliza células diana que es conocido que expresan el antígeno diana reconocido por la región ligante de antígeno del anticuerpo,
- 2) el ensayo utiliza células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) aisladas a partir de sangre de un donante sano seleccionado aleatoriamente, como células efectoras,
- 3) el ensayo se lleva a cabo siguiendo el protocolo siguiente:

- i) se aíslan las CMSP utilizando procedimientos estándares de centrifugación en gradiente de densidad y se suspenden a una densidad de 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI,
- ii) se cultivan las células diana mediante métodos de cultivo de tejido estándares, se recolectan de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 μ Curies de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml,
- iii) se transfieren 100 microlitros de la suspensión final de células diana anteriormente indicada a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos,
- iv) el anticuerpo se diluye en serie de 4.000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microtitulación de 96 pocillos, llevando a cabo ensayos por triplicado de concentraciones del anticuerpo que cubren el intervalo completo de concentraciones anteriormente indicado,
- v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (v/v) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis) en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv, anteriormente),
- vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpos (punto iv, anteriormente),
- vii) la placa de microtitulación de 96 pocillos seguidamente se centrifuga a 50xg durante 1 minuto y se incuba durante 1 hora a 4°C,

viii) se añaden 50 microlitros de la suspensión de CMSP (punto i), anteriormente) a cada pocillo, dando lugar a una proporción de efector:célula diana de 25:1 y las placas se introducen en un incubador bajo una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C durante 4 horas,

ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recolecta y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantifica utilizando un contador gamma,

x) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo según la fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en la que ER es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix), anteriormente) para dicha concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix), anteriormente) para los controles MR (ver el punto v), anteriormente), y SR es la radioactividad media cuantificada (ver el punto ix), anteriormente) para los controles SR (ver el punto vi), anteriormente).

4) la expresión "ADCC incrementada" se define como un incremento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a ensayo anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo necesaria para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observado dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometidas a ensayo anteriormente. El incremento de la ADCC es relativo a la ADCC, que se ha medido utilizando el ensayo anteriormente indicado, mediada por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, utilizando los mismos métodos estándares de producción, purificación, formulación y almacenamiento conocidos por el experto en la materia, pero que no ha sido producido por las células huésped manipuladas para sobreexpresar GnTIII.

En un aspecto, la presente exposición se refiere a moléculas de unión a antígeno que presentan la especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino y al descubrimiento de que sus funciones efectoras pueden potenciarse mediante la alteración de la glucosilación. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico. En una realización preferente, la exposición se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que comprende los CDR mostrados en la figura 7. Específicamente, en una realización preferente, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7. (CDR V_{H-1}); (b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23. (CDR V_{H-2}) y SEC ID nº 24. En otra realización preferente, la exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10. (CDR V_L). En una realización, cualquiera de dichos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende el dominio V_H del anticuerpo B-Ly1 murino mostrado en la figura 1, o una variante del mismo, y un polipéptido no murino. En otra realización preferente, la invención se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende el dominio V_L del anticuerpo B-Ly1 murino mostrado en la figura 2, o una variante del mismo, y un polipéptido no murino.

En otro aspecto, la exposición se refiere a moléculas de unión a antígeno que comprenden una o más CDR truncadas de Bly-1. Dichas CDR truncadas contienen, como mínimo, los residuos aminoácidos determinantes de especificidad para la CDR dada. La expresión "residuo determinante de especificidad" se refiere a aquellos residuos que se encuentran directamente implicados en la interacción con el antígeno. En general, sólo aproximadamente un quinto a un tercio de los residuos en una CDR dada participa en la unión a un antígeno. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden identificarse, por ejemplo, mediante computación de contactos interatómicos obtenidos del modelado tridimensional y la determinación de la variabilidad de secuencia en una posición de residuo dada de acuerdo con los métodos descritos en Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139, 1995.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la exposición se refiere además a un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferentemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos residuos determinantes de especificidad de cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (por ejemplo humanizado). La exposición se refiere además a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la exposición se refiere a una molécula de unión a antígeno que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada del mismo que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha región determinante de complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas del mismo que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una

realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, por ejemplo humanizado. La exposición se refiere además a métodos de preparación de dichas moléculas de unión a antígeno y la utilización de las mismas en el tratamiento de enfermedades, incluyendo los linfomas de células B.

- 5 Es conocido que operan varios mecanismos en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CD20, entre ellos la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la inducción de la parada del crecimiento o apoptosis. Por ejemplo, la mayor parte de la evidencia experimental indica que el Rituximab funciona mediante mecanismos efectores convencionales medidos mediante ensayos de CDC y ADCC. De manera similar, se ha demostrado que la resistencia de las diferentes células de linfoma frente al
- 10 Rituximab in vivo es una función de su sensibilidad a la CDC in vitro. En contraste, el modo de acción in vivo de otro anticuerpo que ha sido autorizado para el uso terapéutico, B1, no requiere ni complemento ni actividad de células asesinas naturales (NK). Por el contrario, la eficacia de B1 in vivo se debe a su capacidad de inducir una potente apoptosis.
- 15 En general, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 se clasifican en dos categorías diferentes basándose en su mecanismo de acción en la erradicación de las células de linfoma. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo I utilizan principalmente el complemento para eliminar las células diana, mientras que los anticuerpos de tipo II funcionan mediante diferentes mecanismos, principalmente la apoptosis. El Rituximab y 1F5 son ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo I, mientras que B1 es un ejemplo de un anticuerpo de tipo II. Ver, por ejemplo, Cragg M.S. y Glennie M.J., *Blood* 103(7):2738-2743 (abril de 2004); Teeling, J.L. et al., *Blood* 104(6):1793-1800 (septiembre de 2004).

La presente exposición es el primer caso conocido de manipulación de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II para que presente funciones efectoras incrementadas, tales como la ADCC, conservando simultáneamente una potente capacidad de apoptosis. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente exposición se refiere a un

25 anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado que presenta una ADCC incrementada como resultado de dicha manipulación y sin pérdida sustancial de capacidad de inducción de apoptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II han sido manipulados para presentar un patrón alterado de glucosilación en la región Fc. En una realización particular, la glucosilación alterada comprende un nivel incrementado de residuos complejos bisectados en la región Fc. En otra realización particular, la glucosilación alterada comprende un número reducido de residuos fucosa en la región Fc. Ver la patente US Appl. Pub. n° 2004 0093621, de Shitara et al. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II han sido sometidos a la manipulación polipeptídica, tal como se enseña en la patente US n° 6.737.056, de Presta o en la patente US Appl. Pub. n° 2004 0185045 (Macrogenics) o en la patente US Appl. Pub. n° 20040132101 (Xencor).

35 La exposición se refiere además a métodos de preparación de dichos anticuerpos de tipo II manipulados y a métodos de utilización de dichos anticuerpos en el tratamiento de diversos trastornos de células B, incluyendo los linfomas de células B.

Se han descrito anticuerpos quiméricos de ratón/humanos. Ver, por ejemplo, Morrison S. L. et al., *PNAS* 11:6851-6854 (noviembre de 1984); publicación de patente europea n° 173494; Boulianna G. L et al., *Nature* 312:642 (diciembre de 1984); Neubeiger M. S. et al., *Nature* 314:268 (marzo de 1985); publicación de patente europea n° 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135:8564 (noviembre de 1985); Sun L. K et al., *Hybridoma* 5(1):517, 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074, 1986). Ver, de manera general, Muron, *Nature* 312:597 (diciembre de 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3) (marzo de 1985); Marx, *Science* 229:455 (agosto de 1985); and Morrison, *Science* 229:1202-1207 (septiembre de 1985). Robinson et al., en la publicación de patente PCT n° WO/88104936 describe un anticuerpo quimérico con región constante humana y región variable murina, que presenta especificidad para un epítipo de CD20; la parte murina del anticuerpo quimérico de las referencias de Robinson se derivan del anticuerpo monoclonal de ratón 2H7 (gamma 2b, kappa). Aunque la referencia indica que el anticuerpo quimérico descrito es un «candidato prioritario» para el tratamiento de los trastornos de las células B, esta afirmación puede considerarse no más que una sugerencia para el experto para que determine si la sugerencia es exacta o no para dicho anticuerpo particular, en particular debido a que la referencia no dispone de ningún datos para apoyar su afirmación de eficacia terapéutica, y especialmente, de datos en los que se utilicen mamíferos superiores, tales como primates o seres humanos.

55 Se encuentran disponibles de la técnica metodologías para generar anticuerpos quiméricos. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada pueden expresarse separadamente utilizando, por ejemplo, cadenas ligeras de inmunoglobulina y cadenas pesadas de inmunoglobulina en plásmidos separados, o en un único vector (por ejemplo policistrónico). A continuación, pueden purificarse y ensamblarse in vitro para formar anticuerpos completos; se han descrito metodologías para llevar a cabo dicho ensamblaje. Ver, por ejemplo, Scharff M., *Harvey Lectures* 69:125, 1974. También se han descrito parámetros de reacción in vitro para la formación de anticuerpos IgG a partir de cadenas ligeras y pesadas aisladas reducidas. Ver, por ejemplo, Sears et al., *Biochem.* 16(9):2016-25, 1977. En una realización particularmente preferente, la MUA quimérica descrita en la presente memoria es un anticuerpo humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos de la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse MUA humanizadas descritas en la presente memoria, según los métodos de la patente US n° 5.225.539, de Winter; la patente US N° 6.180.370, de Queen et al., o la patente US n° 6.632.927, de Adair et al.

Preferentemente, en un anticuerpo humanizado se ha introducido uno o más residuos aminoácidos procedentes de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización esencialmente puede llevarse a cabo siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536, 1988) mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, dichos anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), en los que se ha sustituido una parte sustancialmente inferior a un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos anti-CD20 humanizados de la invención comprenden regiones constantes de una inmunoglobulina humana.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse en la preparación de anticuerpos humanizados resulta muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más similar a la del roedor seguidamente se acepta como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296, 1993; Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987). Otro método para seleccionar la secuencia marco humana es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco de roedor completo (es decir, FR1, FR2, FR3 y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (por ejemplo FR1 y FR2) con una biblioteca de secuencias de una región variable humana conocida que corresponden a dicha subregión de marco (por ejemplo según se determina a partir de la numeración Kabat) y elegir la secuencia humana para cada subregión o combinación que sea más similar a la de roedor (Leung, solicitud publicada de patente US nº 2003/0040606A1, publicada el 27 de febrero de 2003). Otro método utiliza una región marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede utilizarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623, 1993).

También resulta importante que los anticuerpos se humanicen conservando la afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un método preferente, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas se encuentran disponibles comúnmente y resultarán familiares para el experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estos resultados permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse con el receptor e importar secuencias de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable se encuentran directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión de los antígenos.

En otra realización, las moléculas de unión a antígeno de la presente invención se manipulan para que presenten una afinidad de unión incrementada según, por ejemplo, los métodos dados a conocer en la patente US Appl. Pub. nº 2004 0132066, de Balint et al.

En una realización, la molécula de unión a antígeno descrita en la presente memoria se conjuga con una fracción adicional, tal como un marcaje radioactivo o una toxina. Dichas MUA conjugadas pueden producirse mediante numerosos métodos que son bien conocidos de la técnica.

Una diversidad de radionucleidos es aplicable a la presente exposición y al experto en la materia se le atribuye la capacidad de determinar fácilmente qué radionucleido resulta más apropiado bajo una diversidad de circunstancias. Por ejemplo, el ¹³¹yodo es un radionucleido bien conocido que se utiliza para la inmunoterapia dirigida. Sin embargo, la utilidad clínica del ¹³¹yodo puede encontrarse limitada por varios factores, entre ellos: una vida media física de ocho días, el deshalogenado del anticuerpo yodado tanto en la sangre como en los sitios tumorales, y las características de emisión (por ejemplo un componente gamma elevado) que pueden resultar subóptimas para una deposición localizada de la dosis en el tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad de unir grupos quelantes metálicos a proteínas ha incrementado las oportunidades de utilizar otros radionucleidos, tales como ¹¹¹indio e ⁹⁰itrio. El ⁹⁰itrio proporciona varios beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la vida media de 64 horas del ⁹⁰itrio es suficientemente larga para permitir la acumulación del anticuerpo en el tumor y, al contrario que, por ejemplo, el ¹³¹yodo, el ⁹⁰itrio es un emisor beta puro de alta energía sin irradiación gamma acompañante durante su descomposición, con un alcance en el tejido de entre 100 y 1.000 diámetros celulares. Además, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con ⁹⁰itrio. Además, la internalización del anticuerpo marcado no resulta necesaria para la

eliminación celular, y la emisión local de radiación ionizante debería resultar letal para las células tumorales contiguas que no presentan el antígeno diana.

5 Las dosis eficaces de tratamiento único (es decir, las cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos anti-CD20 marcados con ⁹⁰itrio se encuentran comprendidas entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis eficaces no ablativas de médula en un tratamiento único de anticuerpos anti-CD20 marcados con ¹³¹yodo se encuentran comprendidas entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis eficaces ablativas en un tratamiento único (es decir, que pueden requerir el trasplante de médula ósea autóloga) de anticuerpos anti-CD20 marcados con ¹³¹yodo se encuentran comprendidas entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferentemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo anti-CD20 quimérico, debido a la semivida en circulación más prolongada en comparación con los anticuerpos murinos, las dosis eficaces no ablativas de médula en un único tratamiento eficaz de anticuerpos anti-CD20 quiméricos marcados con ¹³¹yodo se encuentran comprendidas entre aproximadamente 5 y aproximadamente 400 mCi, más preferentemente son inferiores a aproximadamente 30 mCi. El criterio para la obtención de imágenes para, por ejemplo, el marcaje de ¹¹¹indio, es típicamente de menos de aproximadamente 5 mCi.

20 Con respecto a los anticuerpos anti-CD20 marcados radioactivamente, la terapia con los mismos también puede realizarse en un tratamiento terapéutico único o en tratamientos múltiples. Debido al componente radionucleido, resulta preferente que, antes del tratamiento, se "recolecten" células madre periféricas ("CMP") o de médula ósea ("MO") para los pacientes que experimenten toxicidad potencialmente letal de la médula ósea debida a la radiación. La MO y/o las CMP se recolectan utilizando técnicas estándares, y después se purgan y se congelan para la posible reinfusión. Además, resulta más preferente que antes del tratamiento se realice un estudio de dosimetría diagnóstica utilizando un anticuerpo marcado diagnóstico (por ejemplo utilizando indio-111), un propósito del cual es garantizar que el anticuerpo terapéuticamente marcado (por ejemplo utilizando itrio-90) no resulte innecesariamente "concentrado" en cualquier órgano o tejido normal.

30 En una realización preferente, la presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 3, posteriormente. La exposición se refiere además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos mostrada en la Tabla 2, posteriormente. En otra realización, la exposición se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos en la Tabla 3. La exposición comprende además un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los constructos en la Tabla 3 con sustituciones de aminoácidos conservadoras.

40

TABLA 2

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	SEC ID nº
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	29

ES 2 672 640 T3

<p>B-HH2</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>31</p>
<p>B-HH3</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TCTGTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u></p>	<p>33</p>
<p>B-HH4</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>TCTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>35</p>
<p>B-HH5</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>37</p>
<p>B-HH6</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATCAATT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>39</p>

ES 2 672 640 T3

<p>B-HH7</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATCTCGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>41</p>
<p>B-HH8</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACATACAGCTGGATGAAC</u> <u>TGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>43</p>
<p>B-HH9</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>45</p>
<p>B-HL1</p>	<p><u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATGA</u> <u>CACGGGACACGTCCACTCCACCGTCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>47</p>
<p>B-HL2</p>	<p><u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACGCAGAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>49</p>

ES 2 672 640 T3

<p>B-HL3</p>	<p><u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTC AAGGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>51</p>
<p>B-HL4</p>	<p><u>CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAAGTTAA</u> <u>GAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u></p>	<p>53</p>
<p>B-HL8</p>	<p><u>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTC AAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>55</p>
<p>B-HL10</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCAATTCAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTC AAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTC TCGA</u></p>	<p>57</p>

<p>B-HL11</p>	<p><u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u></p>	<p>59</p>
<p>B-HL12</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGCCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>61</p>
<p>B-HL13</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGCCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>63</p>
<p>B-HL14</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCG</u> <u>GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGCCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>65</p>

<p>B-HL15</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAATGCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>67</p>
<p>B-HL16</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>GTCAGCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAATGCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>69</p>
<p>B-HL17</p>	<p><u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAATGCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u></p>	<p>71</p>
<p>Secuencia de señal de VH</p>	<p><u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC</u> <u>AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC</u></p>	<p>73</p>
<p>B-KV1</p>	<p><u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCC</u> <u>GTCACCCCTGGAGAGCCCCGCCAGCATTAGCTGCAG</u> <u>GTCTAGCAAGAGCCTCTTGACAGCAATGGCATCA</u> <u>CTTATTTGTATTGGTACCTGCAAAAAGCCAGGGCAG</u> <u>TCTCCACAGCTCCTGATTTATCAAATGTCCAACCTT</u> <u>GTCTCTGGCGTCCCTGACCGGTTCTCCGGATCCGGG</u> <u>TCAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGGGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCGCTC</u> <u>AGAATCTAGAACTTCCTTACACCTTCGGCGGAGGG</u> <u>ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG</u></p>	<p>75</p>
<p>Secuencia de señal de VL</p>	<p><u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT</u> <u>CCTGCTGCTCTGGTCCAGGTGCCAGGTGT</u></p>	<p>77</p>

ES 2 672 640 T3

TABLA 3

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEC ID nº
B-HH1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYTFSYSWMSWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYAQKFOGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQGL</u> <u>TVVSS</u>	<u>30</u>
B-HH2	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYAFSYSWMN</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>32</u>
B-HH3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYAFSYSWMN</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYLCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQGL</u> <u>LTVVSS</u>	<u>34</u>
B-HH4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKVSGYAFSYSWMN</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>36</u>
B-HH5	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYAFSYSWMSWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>38</u>
B-HH6	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYAFSYSWIN</u> <u>WVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQGL</u> <u>TVVSS</u>	<u>40</u>
B-HH7	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYAFSYSWISWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQGL</u> <u>TVVSS</u>	<u>42</u>
B-HH8	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTYSWMN</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>44</u>
B-HH9	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFSYSWMN</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>46</u>
B-HL1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTYSWMH</u> <u>WV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYAQKFOGRVTMTRDT</u> <u>STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARN</u> <u>VDGYWLVYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>	<u>48</u>

ES 2 672 640 T3

B-HL2	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFTYSWMHWV</u> <u>QQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYAEKFOGRVTITADTS</u> <u>TDAYMELSSLRSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFTYSWMNWV</u> <u>QQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADTS</u> <u>TDAYMELSSLRSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>52</u>
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGYFTFTYSWMSWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYAOKFOGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>54</u>
B-HL8	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LTVVSS</u>	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>58</u>
B-HL11	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LTVVSS</u>	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LTVVSS</u>	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>64</u>
B-HL14	<u>EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVQLVESGGGLVKPGSSRLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LTVVSS</u>	<u>68</u>

B-HL16	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGL</u> <u>VTVSS</u>	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>72</u>
Secuencia de señal de VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>
B-KV1	<u>DIVMTOTPLSLPVTPGEASISCRSSKLLHSNGITYLYWY</u> <u>LOKPGOSPOLLIYOMSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLKIS</u> <u>RVEAEDVGVYYCAONLELPYTFGGGTKVEIKRTV</u>	<u>76</u>
Secuencia de señal de VL	<u>MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC</u>	<u>78</u>

En otra realización preferente, la presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la fig. 1 o en la fig. 2. La exposición se refiere además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la fig. 5 o en la fig. 6. En otra realización, la exposición se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la fig. 5 o en la fig. 6. La exposición comprende además un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta cualquiera de las secuencias de aminoácidos fig. 1, fig. 2, fig. 5 o en la fig. 6 con sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En otra realización, la presente exposición se refiere a un vector de expresión y/o a una célula huésped, que comprende uno o más polinucleótidos aislados indicados en la presente memoria.

Generalmente, puede utilizarse cualquier tipo de línea celular en cultivo para expresar la MUA de la presente invención. En una realización preferente, se utilizan células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de otro mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales, como la línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas indicadas en la presente memoria.

La eficacia terapéutica de las MUA indicadas en la presente memoria puede potenciarse mediante la producción de las mismas en una célula huésped que expresa adicionalmente un polinucleótido codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII. En una realización preferente, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en el Golgi. En otra realización preferente, la expresión de las MUA de la presente invención en una célula huésped que expresa un polinucleótido codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII resulta en MUA con afinidad de unión a receptores Fc incrementada y una función efectora incrementada. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente exposición se refiere a una célula huésped que comprende: (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII, y (b) un polinucleótido aislado codificante de una MUA indicada en la presente memoria, tal como un anticuerpo quimérico o humanizado que se une a CD20 humano. En una realización preferente, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II. Los métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y la utilización de los mismos para producir anticuerpos con funciones efectoras incrementadas se dan a conocer en la solicitud provisional de patente US nº 60/495.412.

En otra realización preferente, la MUA quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que presenta la especificidad de unión del anticuerpo B-LY1 murino. En una realización particularmente preferente, el anticuerpo quimérico comprende un Fc humano. En otra realización preferente, el anticuerpo ha sido primatizado o humanizado.

En una realización, puede expresarse uno o varios polinucleótidos codificantes de una MUA de la presente exposición, bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulada. Entre los sistemas de expresión regulada adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un sistema de expresión

regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión con interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoide, un sistema promotor inducible por la temperatura y un sistema de expresión inducible por metal metaloneína. En el caso de que el sistema de la célula huésped comprenda varios ácidos nucleicos diferentes codificantes de una MUA indicada en la presente memoria, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otras se expresan bajo el control de un promotor regulado. El nivel máximo de expresión se considera que es el nivel más alto posible de expresión estable de polipéptido que no presenta un efecto adverso significativo sobre la tasa de crecimiento celular, y se determinará mediante experimentación rutinaria. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos generalmente conocidos de la técnica, incluyendo el análisis de transferencia western utilizando un anticuerpo específico para la MUA o un anticuerpo específico para un péptido-etiqueta fusionado a la MUA, y el análisis de transferencia northern. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede ligarse operativamente a un gen informador; los niveles de expresión de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino se determinan mediante la medición de una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen informador. El gen informador puede transcribirse conjuntamente con el ácido o ácido nucleicos codificantes de dicho polipéptido de fusión en forma de una única molécula de ARNm; sus secuencias codificantes respectivas pueden unirse mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o mediante un intensificador de traducción independiente de caperuza (CITE). El gen informador puede traducirse conjuntamente con por lo menos un ácido nucleico codificante de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino, de manera que se forma una única cadena polipeptídica. Los ácidos nucleicos codificantes de las MUA indicadas en la presente memoria pueden ligarse operativamente al gen informador bajo el control de un único promotor, de manera que el ácido nucleico codificante del polipéptido de fusión y el gen informador se transcriben en una molécula de ARN que se procesa alternativamente para formar dos moléculas separadas de ARN mensajero (ARNm): uno de los ARNm resultantes se traduce en dicha proteína formadora, y el otro se traduce en dicho polipéptido de fusión.

Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos por el experto en la materia para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una MUA que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino conjuntamente con las señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Entre estos métodos se incluyen técnicas *in vitro* de ADN recombinante, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989, y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y., 1989.

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar la secuencia codificante de las MUA de la presente invención. Preferentemente se utilizan células de mamífero como sistemas de célula huésped transfectados con plásmido de ADN recombinante o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante del polipéptido de fusión. Más preferentemente, se utilizan como sistema de célula huésped células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales. Se describen algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección en las referencias siguientes, y referencias contenidas en las mismas: Borth et al., *Biotechnol. Bioeng.* 71(4):266-73, 2000-2001, en: Werner et al., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80, 1998, en: Andersen y Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123, 2002, en: Chadd y Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194, 2001, y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454, 2001). En realizaciones alternativas, pueden contemplarse otros sistemas de célula huésped eucariótica, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de una MUA de la presente invención, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo baculovirus) que contienen la secuencia codificante de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo el virus del mosaico de la coliflor, VMCA; el virus del mosaico del tabaco, VMT) o transformados con vectores de expresión plásmidos recombinantes (por ejemplo el plásmido Ti) que contienen la secuencia codificante de la MUA de la invención; o sistemas de células animales infectados con vectores de expresión virus recombinante (por ejemplo adenovirus, virus Vaccinia), incluyendo líneas celulares manipuladas para que contengan múltiples copias del AND codificante de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino establemente amplificado (CHO/dhfr) o inestablemente amplificado en cromosomas dobles diminutos (por ejemplo líneas celulares murinas). En una realización, el vector que comprende el polinucleótido o polinucleótidos codificantes de la MUA de la invención es policistónico. Además, en una realización la MUA comentada anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferente la MUA es un anticuerpo humanizado.

Para los métodos de la presente exposición, se prefiere generalmente la expresión estable a la expresión transitoria debido a que típicamente consigue resultados más reproducibles y también permite más fácilmente la producción a gran escala. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes víricos de replicación, las células huésped pueden transformarse con los ácidos nucleicos codificantes respectivos controlados por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo promotor, intensificador, secuencias, terminadoras de transcripción,

sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, las células manipuladas pueden dejarse en cultivo durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y después pasarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante proporciona resistencia a la selección y permite la selección de células que han integrado establemente el plásmido en sus cromosomas y que crecen para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse para formar líneas celulares.

Existen varios sistemas de selección que pueden utilizarse, incluyendo, aunque sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026, 1962), y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817, 1980), que pueden utilizarse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt, respectivamente. Además, puede utilizarse una resistencia antimetabolito como base de selección para los genes dhfr, que proporciona resistencia al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:3567, 1989; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981), gpt, que proporciona resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072, 1981), neo, que proporciona resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1, 1981), e higo, que proporciona resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30:147, 1984). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047, 1988), el sistema de glutamina sintasa, y la ODC (ornitina descarboxilasa), que proporciona resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, editor, 1987).

La presente exposición se refiere asimismo a un método para modificar el perfil de glucosilación de las MUA de la presente invención que son producidas por una célula huésped, que comprende expresar en dicha célula huésped un ácido nucleico codificante de una MUA de la invención y un ácido nucleico codificante de un polipéptido con actividad de GnTIII, o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Preferentemente, el polipéptido modificado es IgG o un fragmento de la misma que comprende la región Fc. En una realización particularmente preferente, la MUA es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

Las MUA modificadas producidas por las células huésped de la invención muestran una afinidad de unión de receptor Fc incrementada y/o una función efectora incrementada como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferente, la MUA es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la región Fc. Preferentemente la afinidad de unión de receptor Fc incrementada es unión incrementada a un receptor activador Fcγ, tal como el receptor FcγRIIIa. La función efectora incrementada preferentemente es un incremento de uno o más de los siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo incrementada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) incrementada, secreción de citoquinas incrementada, incorporación incrementada de antígenos por parte de células presentadoras de antígeno mediada por complejo inmunológico, citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a células polimorfonucleares (PMNs), unión incrementada a monocitos, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, maduración de células dendríticas incrementada y cebado de células T incrementado.

La presente exposición se refiere asimismo a un método para producir una MUA indicada en la presente memoria, que presenta oligosacáridos modificados en una célula huésped, que comprende: (a) cultivar una célula huésped manipulada para que exprese por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de una MUA según la presente invención, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de GnTIII se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha MUA producida por dicha célula huésped, y (b) aislar dicha MUA. En una realización preferente, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferente, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en el Golgi.

Preferentemente, el dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II o de GnTI. Alternativamente, el dominio de localización en Golgi se selecciona de entre el grupo que consiste de: el dominio de localización de la manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de la α 1-6-fucosiltransferasa nuclear. las MUA producidas mediante los métodos de la presente invención presentan una afinidad de unión de receptores Fc incrementada y/o una función efectora incrementada. Preferentemente, la función efectora incrementada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada (incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, secreción incrementada de citoquinas, incorporación de antígeno mediada por complejo inmunológico incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a monocitos, unión incrementada a células polimorfonucleares, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, maduración incrementada de células dendríticas o cebador de células T incrementada. La afinidad de unión a receptores Fc incrementada preferentemente es unión incrementada a receptores activadores de Fc, tales como FcγRIIIa. En una realización particularmente preferente, la MUA es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En otra realización, la presente exposición se refiere a una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino producido mediante los métodos de la invención, que presenta una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. Se encuentra contemplado que dicha MUA comprenda anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprendan la región Fc. En una realización preferente la MUA es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc de la MUA es de por lo menos 50%, más preferentemente de por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, o por lo menos 90%, y más preferentemente de por lo menos 90% a 95% de los oligosacáridos totales. En todavía otra realización, la MUA producida mediante los métodos descritos en la presente memoria presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es de por lo menos 50%, preferentemente de por lo menos 60% a 70%, más preferentemente de por lo menos 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser de tipo híbrido o de tipo complejo. En una realización particularmente preferente, la MUA producida mediante las células huésped y métodos de la invención presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados bisectados pueden ser híbridos o complejos. Específicamente, los métodos de la presente invención pueden utilizarse para producir MUAs en las que por lo menos 15%, más preferentemente por lo menos 20%, más preferentemente por lo menos 25%, más preferentemente por lo menos 30%, más preferentemente por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de la MUA son bisectados, no fucosilados. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para producir polipéptidos en los que por lo menos 15%, más preferentemente por lo menos 20%, más preferentemente por lo menos 25%, más preferentemente por lo menos 30%, más preferentemente por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son bisectados híbridos no fucosilados.

En otra realización, la presente exposición se refiere a una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino que ha sido manipulado para que presente una función efectora incrementada y/o una afinidad de unión a receptores Fc incrementada, producido mediante los métodos descritos en la presente memoria. Preferentemente, la función efectora incrementada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada (incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incrementada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) incrementada, secreción incrementada de citoquinas, incorporación de antígeno mediada por complejo inmunológico incrementada, unión incrementada a células NK, unión incrementada a macrófagos, unión incrementada a monocitos, unión incrementada a células polimorfonucleares, señalización directa incrementada inductora de apoptosis, entrecruzamiento incrementado de anticuerpos unidos a diana, maduración incrementada de células dendríticas o cebador de células T incrementada. En una realización preferente, la afinidad de unión de receptores Fc incrementada es la unión incrementada a un receptor activador de Fc, más preferentemente FcγRIIIa. En una realización, la MUA es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización particularmente preferente, la MUA es un anticuerpo humanizado.

La presente exposición se refiere asimismo a composiciones farmacéuticas que comprenden las MUA indicadas en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente exposición se refiere asimismo a la utilización de dichas composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento del cáncer. Específicamente, la presente exposición se refiere a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria.

La presente exposición proporciona asimismo métodos para la generación y utilización de sistemas de células huésped para la producción de glucoformas de las MUA indicadas en la presente memoria, que presentan una afinidad de unión a receptores Fc incrementada, preferentemente una unión a receptores activadores de Fc incrementada, y/o que presentan funciones efectoras incrementadas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La metodología de glucomanipulación que puede utilizarse con las MUA descritas en la presente memoria ha sido descrita en mayor detalle en la patente US nº 6.602.684 y en la solicitud provisional de patente US nº 60/441.307 y el documento nº WO 2004/065540.

Las MUA de la presente exposición alternativamente pueden glucomanipularse para que presenten un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc según las técnicas dadas a conocer en el documento EP nº 1 176 195 A1.

Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con un patrón de glucosilación alterado

La presente exposición proporciona sistemas de expresión de células huésped para la generación de las MUA de la presente invención que presentan patrones de glucosilación modificados. En particular, la presente exposición describe sistemas de células huésped para la generación de glucoformas de las MUA descritas en la presente memoria que presentan un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención proporciona sistemas de expresión de células huésped seleccionados o manipulados para que expresen un polipéptido que presenta actividad de GnTIII. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Específicamente,

dichos sistemas de expresión de células huésped pueden manipularse para que comprendan una molécula de ácido nucleico recombinante codificante de un polipéptido que presenta GnTIII, operativamente ligado a un sistema promotor constitutivo o regulado.

5 En una realización específica, la presente exposición proporciona una célula huésped que ha sido manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido de fusión que presenta actividad de GnTIII y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En un aspecto, la célula huésped se manipula con una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos un gen codificante de un polipéptido de fusión que presenta actividad de GnTIII y que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

15 Generalmente, puede utilizarse cualquier tipo de línea celular en cultivo, incluyendo las líneas celulares comentadas anteriormente, como fondo para manipular las líneas de células huésped descritas en la presente memoria. En una realización preferente, se utilizan células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de otro mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales, como la línea celular de fondo para generar las células huésped manipuladas indicadas en la presente memoria.

20 Se encuentra contemplado que la exposición comprenda cualquier célula huésped manipulada que expresa un polipéptido que presenta actividad de GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo tal como se define en la presente memoria.

25 Puede expresarse uno o varios ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII, bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulada. Dichos sistemas son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los sistemas comentados anteriormente. En el caso de que varios ácidos nucleicos diferentes codificantes de polipéptidos de fusión que presentan actividad de GnTIII y que comprenden el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo se encuentren dentro del sistema de células huésped, algunos de ellos pueden expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que presentan actividad de GnTIII se determinan mediante métodos generalmente conocidos de la técnica, incluyendo el análisis de transferencia Western, el análisis de transferencia northern, el análisis de expresión de genes informadores o la medición de la actividad de GnTIII. Alternativamente, puede utilizarse una lectina que se una a productos biosintéticos de GnTIII, por ejemplo la lectina E₄-PHA. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo funcional que mide la unión incrementada del receptor Fc o la función efectora incrementada mediada por anticuerpos producidos por las células manipuladas con el ácido nucleico codificante de un polipéptido con actividad de GnTIII.

Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que presenta un patrón de glucosilación modificado

40 Las células huésped que contienen la secuencia codificante de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino y que expresan los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse mediante por lo menos cuatro enfoques generales: (a) hibridación ADN-ADN o ADN-ARN, (b) presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras", (c) evaluación del nivel de transcripción según se mide a partir de la expresión de los transcritos de ARNm respectivos en la célula huésped, (d) detección del producto génico según medición mediante inmunoensayo o a partir de su actividad biológica.

50 En el primer enfoque, la presente de la secuencia codificante de una MUA quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo Bly-1 murino y la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de GnTIII pueden detectarse mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN utilizando sondas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias codificantes respectivas, respectivamente, o partes o derivados de las mismas.

55 En el segundo enfoque, el sistema recombinante de vector de expresión/huésped puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones génicas «marcadoras» (por ejemplo actividad de timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, en el caso de que la secuencia codificante de la MUA descrita en la presente memoria, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de GnTIII se inserte dentro de una secuencia génica marcadora del vector, pueden identificarse los recombinantes que contienen las secuencias codificantes respectivas, a partir de la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, puede situarse un gen marcador en tándem con las secuencias codificantes bajo el control del mismo promotor o de promotores diferentes utilizados para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o la selección indica la expresión de la secuencia codificante de la MUA de la invención y la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de GnTIII.

En el tercer enfoque, puede evaluarse mediante ensayos de hibridación la actividad transcripcional de la región codificante de la MUA de la invención, o de un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de GnTIII. Por ejemplo, puede aislarse ARN y analizarse mediante transferencia northern utilizando una sonda homóloga a las secuencias codificantes de la MUA de la invención, o de un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que presenta actividad de GnTIII o partes particulares de la misma. Alternativamente, pueden extraerse los ácidos nucleicos totales de la célula huésped y someterse a ensayo para la hibridación a dichas sondas.

En el cuarto enfoque, la expresión de los productos proteicos puede evaluarse inmunológicamente, por ejemplo mediante transferencias western, inmunoensayos tales como la radioinmunoprecipitación o inmunoensayos ligados a enzima. El ensayo definitivo del éxito del sistema de expresión, sin embargo, implica la detección de los productos génicos biológicamente activos.

Generación y utilización de MUA con función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

En realizaciones preferentes, la presente exposición describe glucoformas de MUA quiméricas que presentan sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo B-Lyl murino y que presentan una función efectora incrementada, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. La ingeniería por glucosilación de los anticuerpos ha sido descrita anteriormente. Ver, por ejemplo, la patente US nº 6.602.684.

Los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (mAb) no conjugados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer recientemente han proporcionado resultados esperanzadores. Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25, 1997; Deo et al., Immunology Today 18:127, 1997. Se ha autorizado una IgG1 no conjugada quimérica para el linfoma no de Hodgking de células B foliculares o de grado bajo Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25, 1997, mientras que otro mAb no conjugado, una IgG1 humanizada que reconoce tumores de mama sólidos, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III (Deo et al., Immunology Today 18:127, 1997). Los antígenos de dichos dos mAb se expresan a nivel elevado en sus células tumorales respectivas y los anticuerpos median en la potente destrucción tumoral por células efectoras in vitro e in vivo. En contraste, muchos otros mAb no conjugados con fines especificidades tumorales no pueden inducir funciones efectoras de suficiente potencia para resultar clínicamente útiles (Frost et al., Cancer 80:317-33, 1997; Surfus et al., J. Immunother. 19: 184-91, 1996). Para algunos de dichos mAb más débiles, actualmente se está sometiendo a ensayo una terapia complementaria de citoquinas. La adición de citoquinas puede estimular citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante el incremento de la actividad y número de linfocitos circulantes. (Frost et al., Cancer 80:317-33, 1997; Surfus et al., J. Immunother. 19:184-91, 1996). La ADCC, un ataque lítico sobre las células diana de anticuerpos resulta inducida con la unión de los receptores de leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos (Deo et al., Immunology Today 18:127, 1997).

Un enfoque diferente aunque complementario para incrementar la actividad ADCC de las IgG1 no conjugadas es manipular la región Fc del anticuerpo. Los estudios de ingeniería de proteínas han demostrado que las FcγR interactúan con la región bisagra inferior del dominio CH2 de IgG (Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69, 1996). Sin embargo, la unión de FcγR también requiere la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn 297 conservada presente en la región CH2 (Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69, 1996; Wright y Morrison, Trends Biotech. 15:26-31, 1997), sugiriendo que oligosacárido y polipéptido, ambos, contribuyen directamente al sitio de interacción o que el oligosacárido resulta necesario para mantener una conformación activa del polipéptido con CH2. La modificación de la estructura del oligosacárido, por lo tanto, podría explorarse como medio para incrementar la afinidad de la interacción.

Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos N-ligados en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Al igual que cualquier glucoproteína, un anticuerpo se produce como población de glucoformas que comparten el mismo esqueleto polipeptídico pero que presentan diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glucosilación. Los oligosacáridos normalmente presentes en la región Fc de la IgG sérica son de tipo bisectado complejo (Wormald et al., Biochemistry 36:130-38, 1997), con un nivel bajo de ácido siálico terminal y de N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectada, y un grado variable de galactosilación terminal y de fucosilación nuclear. Algunos estudios sugieren que la estructura de carbohidrato mínima necesaria para la unión de FcγR se encuentra dentro del núcleo del oligosacárido (Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69, 1996).

Las líneas celulares derivadas del ratón y del hámster utilizadas en la industria y en la universidad para la producción de mAb terapéuticos no conjugados normalmente unen los determinantes oligosacáridos necesarios a los sitios Fc. Las IgG expresadas en dichas líneas celulares no presentan, sin embargo, el GlcNAc bisectado observado en cantidades bajas en las IgG séricas (Lifely et al., Glycobiology 318:813-22, 1995). En contraste, recientemente se ha observado que una IgG1 humanizada producida por mieloma de rata (CAMPATH-1H) portaba una GlcNAc bisectada en algunas de sus glucoformas (Lifely et al., Glycobiology 318:813-22, 1995). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzaba una actividad ADCC in vitro máxima similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándares, aunque a concentraciones de anticuerpo significativamente más bajas.

El antígeno CAMPATH normalmente se encuentra presente a niveles elevados sobre las células de linfoma y dicho mAb quimérico presenta una elevada actividad de ADCC en ausencia de un GlcNAc bisectante (Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22, 1995). En la ruta de glucosilación N-ligada, un GlcNAc bisectado resulta añadido por GnTIII (Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81, 1986).

Algunos estudios anteriores utilizaron una única línea celular CHO productora de anticuerpos, que previamente había sido manipulada para expresar, de una manera regulada externamente, diferentes niveles de un enzima de gen GnTIII clonado (Umana P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999). Este enfoque estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad ADCC del anticuerpo modificado. De esta manera, la invención contempla un anticuerpo quimérico recombinante o un fragmento del mismo con la especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino, que presenta una glucosilación alterada resultante de la actividad de GnTIII incrementada. La actividad de GnTIII incrementada resulta en un incremento del porcentaje de oligosacáridos bisectados, así como en una reducción del porcentaje de residuos fucosa en la región Fc de la MUA. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, presenta una afinidad de unión a receptor Fc incrementada y una función efectora incrementada. Además, la invención se refiere al fragmento de anticuerpo y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas.

Aplicaciones terapéuticas de las MUA producidas según los métodos de la exposición

Las MUA indicadas en la presente memoria pueden utilizarse por sí solas para reconocer y eliminar las células tumorales in vivo. Las MUA también pueden utilizarse junto con un agente terapéutico apropiado para tratar el carcinoma humano. Por ejemplo, las MUA pueden utilizarse en combinación con métodos de tratamiento estándares o convencionales, tales como la quimioterapia o la terapia de radiación, o pueden conjugarse o unirse a un fármaco terapéutico, o toxina, así como a un linfocito o a un factor de crecimiento inhibitorio tumoral, para la administración del agente terapéutico en el sitio del carcinoma. Los conjugados de las MUA de la presente invención que son de importancia primordial son: (1) las inmunotoxinas (conjugados de la MUA y un grupo citotóxico), y (2) MUA marcadas (por ejemplo marcadas radioactivamente, marcadas enzimáticamente o marcadas con fluorocromos) en las que el marcaje proporciona un medio para identificar los complejos inmunológicos que incluyen la MUA marcada. Las MUA también pueden utilizarse para inducir la lisis mediante el procedimiento natural del complemento, y para interactuar con células citotóxicas dependientes de anticuerpos presentes normalmente.

La fracción citotóxica de la inmunotoxina puede ser un fármaco citotóxico o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o vegetal, o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de dicha toxina. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas utilizadas son la cadena A diftérica, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfasarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina y enomicina. En otra realización, las MUA se conjugan con fármacos anticáncer de molécula pequeña. Los conjugados de la MUA y dichos grupos citotóxicos se preparan utilizando una diversidad de proteínas bifuncionales que son agentes de acoplamiento. Son ejemplos de estos reactivos: SPDP, IT, derivados bifuncionales de los imidoésteres tales como HCl de adipimidato de dimetilo, ésteres activos tales como sustrato de disuccinimidilo, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos bis-azido tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos tales como 2,6-diisocianato de tolieno y compuestos flúor bis-activos tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. La parte lisante de una toxina puede unirse al fragmento Fab de las MUA. Son conocidas de la técnica algunas toxinas apropiadas adicionales, tal como se pone de manifiesto en, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2002/0128448.

En una realización, una MUA glucomanipulada quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo B-Ly1 murino se conjuga con la cadena A de la ricina. Más ventajosamente, la cadena A de la ricina se desglucosila y se produce por medios recombinantes. Un método ventajoso de preparar la inmunotoxina ricina se describe en Vitetta et al., *Science* 238:1098, 1987.

En el caso de que los conjugados se utilicen para eliminar células cancerosas humanas in vitro con fines diagnósticos, típicamente se añaden al medio de cultivo celular a una concentración de por lo menos aproximadamente 10 nM. La formulación y modo de administración para el uso in vitro no resultan críticos. Normalmente se utilizan las formulaciones acuosas que resultan compatibles con medio de cultivo o de perfusión. La citotoxicidad puede leerse mediante técnicas convencionales para la determinación de la presencia o grado del cáncer.

Tal como se ha comentado anteriormente, puede prepararse un radiofarmacéutico citotóxico para tratar el cáncer mediante conjugación de un isótopo radioactivo (por ejemplo I, Y, Pr) con una MUA glucomanipulada quimérica que presenta sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino. La expresión "fracción citotóxica" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir dichos isótopos.

En otra realización, se rellenan liposomas con un fármaco citotóxico y los liposomas se recubren con las MUA descritas en la presente memoria. Debido a que existen muchas moléculas de CD20 sobre la superficie de la célula B maligna, este método permite la administración de grandes cantidades de fármaco al tipo celular correcto.

5 Las técnicas para conjugar dichos agentes terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas (ver, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243 a 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en: *Controlled Drug Delivery* (2a ed.), Robinson et al. (editores), páginas 623 a 653 (Marcel Dekker, Inc., 1987), Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (editores), páginas 475 a 506, 1985, y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58, 1982).

15 Entre todavía otras aplicaciones terapéuticas para las MUA indicadas en la presente memoria se incluyen la conjugación o unión, por ejemplo mediante técnicas de ADN recombinante, a un enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico, y la utilización de este conjugado de anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco en un agente citotóxico en el sitio tumoral (ver, por ejemplo, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46, 1988; "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives of Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792, 1989, y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy", *FASEB J.* 4:188-193, 1990).

25 Todavía otro uso terapéutico para las MUA indicadas en la presente memoria implica la utilización, en forma no conjugada, en presencia del complemento, o como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco o de anticuerpo-toxina, para eliminar células tumorales de la médula ósea de pacientes de cáncer. Según este enfoque, puede purgarse médula ósea autóloga ex vivo mediante tratamiento con el anticuerpo e infundirse la médula de vuelta en el paciente (ver, por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.* 8(2):81-88, 1988).

30 Además, se encuentra contemplado que la invención comprenda dominios de unión a antígeno que comprenden inmunotoxina de cadena sencilla, que permiten sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo B-Ly1 murino (por ejemplo polipéptidos que comprenden las CDR del anticuerpo B-Ly1 murino) y que además comprenden un polipéptido toxina. Las inmunotoxinas de cadena sencilla de la invención pueden utilizarse para tratar el carcinoma humano in vivo.

35 De manera similar, puede utilizarse una proteína de fusión que comprende por lo menos la región ligante de antígeno de una MUA de la invención a por lo menos una parte funcionalmente activa de una segunda proteína que presenta actividad antitumoral, por ejemplo una linfoquina u oncostatina, para el tratamiento del carcinoma humano in vivo.

40 La presente exposición describe un método para eliminar selectivamente las células tumorales que expresan CD20. Este método comprende hacer reaccionar el inmunoconjugado (por ejemplo la inmunotoxina) descrita en la presente memoria con dichas células tumorales. Estas células tumorales pueden ser de un carcinoma humano.

45 Además, la presente exposición describe un método de tratamiento de los carcinomas (por ejemplo los carcinomas humanos) in vivo. Dicho método comprende administrar en un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que contiene por lo menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo la inmunotoxina) indicados en el mismo.

50 En un aspecto adicional, la exposición se refiere a un método mejorado para tratar los trastornos proliferativos de las células B, incluyendo el linfoma de células B, así como una enfermedad autoinmunitaria producida en su totalidad o en parte por autoanticuerpos patogénicos, basándose en la reducción marcada de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una MUA indicada en la presente memoria en un sujeto humano que lo necesita.

55 En una realización preferente, la MUA es un anticuerpo anti-CD20 glucomanipulado con una especificidad de unión sustancialmente igual a la del anticuerpo B-Ly1 murino. En otra realización preferente, el anticuerpo ha sido humanizado. Entre los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios se incluyen, aunque sin limitación, trombocitopenias de tipo inmunológico, tales como la púrpura trombocitopénica idiopática aguda y la púrpura trombocitopénica idiopática crónica; la dermatomiositis, la corea de Sydenham, la nefritis lupus, la fiebre reumatoidea, los síndromes poliglandulares, la púrpura de Henoch-Schonlein, la nefritis post-estreptocócica, el eritema nodoso, la arteritis de Takayasu, la enfermedad de Addison, el eritema multiforme, la poliarteritis nodosa, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Goodpasture, la tromboangitis obliterante, la cirrosis biliar primaria, la tiroiditis de Hashimoto, la tirotoxicosis, la hepatitis activa crónica, la polimiositis/dermatomiositis, la policondritis, el pénfigo vulgar, la granulomatosis de Wegener, la nefropatía membranosa, la esclerosis lateral amiotrófica, la tabes dorsal, la polimialgia, la anemia perniciosa, la glomerulonefritis de progresión rápida y la alveolitis fibrosante; las respuestas inflamatorias, tales como las enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo la soriasis y la dermatitis (por ejemplo la dermatitis atópica), el escleroderma sistémico y la esclerosis; las respuestas asociadas a la

5 enfermedad intestinal inflamatoria (tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); el síndrome del distrés respiratorio (incluyendo el síndrome del distrés respiratorio adulto, ARDS); la dermatitis, la meningitis, la encefalitis, la uveítis, la colitis, la glomerulonefritis; las condiciones alérgicas tales como el eccema y el asma, y otras condiciones que implican la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, la deficiencia de adhesión leucocitaria, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la diabetes mellitus (por ejemplo la diabetes mellitus de tipo 1 o la diabetes mellitus insulino-dependiente), la esclerosis múltiple, el síndrome de Reynaud, la tiroiditis autoinmunitaria, la encefalomielititis alérgica, el síndrome de Sjörgen, la diabetes de aparición juvenil, y las respuestas inmunológicas asociadas a la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T típicamente presente en la tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; 10 la anemia perniciosa (enfermedad de Addison), enfermedades que implican la diapedesis de los leucocitos; el trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), el síndrome del daño orgánico múltiple, la anemia hemolítica (incluyendo, aunque sin limitación, la crioglobulinemia o la anemia positiva de Coombs), la miastenia grave, las enfermedades mediadas por un complejo antígeno-anticuerpo, la enfermedad antiglomerular de la membrana basal, el síndrome antifosfolípido, la neuritis alérgica, la enfermedad de Graves, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, el pemfigoide bulloso, el pemfigo, las poliendocrinopatías autoinmunitarias, la enfermedad de Reiter, el síndrome del hombre rígido, la enfermedad de Behcet, la arteritis de células gigantes, la nefritis de complejo inmunológico, la nefropatía de IgA, las polineuropatías de las IgM, la púrpura trombocitopénica inmunológica (ITP) o la trombocitopenia autoinmunitaria, etc. En este aspecto de la exposición, las MUA de la invención se utilizan para reducir marcadamente el número de células B normales en la sangre durante un tiempo prolongado. 20

Según la práctica de la presente exposición, el sujeto puede ser humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino y aviar. Otros animales de sangre caliente también se encuentran incluidos en la presente memoria.

25 La exposición proporciona además métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, para tratar un tumor en un sujeto, y para tratar una enfermedad de tipo proliferativo en un sujeto. Estos métodos comprenden administrar en el sujeto una cantidad eficaz de la composición de la invención.

30 Por lo tanto, resulta evidente que la presente exposición comprende composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos para tratar carcinomas humanos, tales como el linfoma de células B. Por ejemplo, la exposición incluye composiciones farmacéuticas para la utilización en el tratamiento de carcinomas humanos, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones de MUA de la invención pueden administrarse mediante modos convencionales de administración, incluyendo, aunque sin limitación, las vías intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o la administración directamente en el tumor. Resulta preferente la administración intravenosa.

40 En un aspecto de la exposición, se preparan formulaciones terapéuticas que contienen las MUA indicadas en la presente memoria para el almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los diluyentes, portadores, excipientes o estabilizadores aceptables resultan no tóxicos para el receptor a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; 45 antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenes, tales como metilparabén o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; 50 aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

55 Se describen formulaciones de MUA anti-CD20 ejemplares en el documento n° WO 98/56418. Esta publicación describe una formulación multidosis líquida que comprende 40 mg/ml de Rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencilico al 0,9%, polisorbato 20 al 0,02% a pH 5,0, que presenta una vida de almacenamiento mínima de dos años a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/ml de Rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de citrato sódico dihidrato, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección, pH 6,5. En la presente invención, el RITUXAN® se sustituye por una MUA indicada en la presente memoria. 60

65 Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen en el documento n° WO 97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado hasta una

concentración elevada de proteínas y la formulación reconstituida puede administrarse subcutáneamente en el mamífero que debe tratarse en la presente memoria.

5 La formulación en la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Por ejemplo, puede resultar deseable proporcionar adicionalmente un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citoquina o un agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúa sobre las células T, tal como la ciclosporina, o un anticuerpo que se una a células T, por ejemplo uno que se una a LFA-1). La cantidad eficaz de este otro agente depende de la cantidad e antagonista presente en la formulación, del tipo de enfermedad o trastorno o del tratamiento, y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan a las mismas dosis y por vías de administración iguales a las utilizadas anteriormente en la presente memoria, o de entre aproximadamente 1% y 99% de las dosis utilizadas hasta el momento.

15 Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidales de fármaco (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980.

20 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, las cuales se encuentran en la forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolído) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

30 Las formulaciones que deben utilizarse para la administración in vivo deben ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

35 Las composiciones de la invención pueden encontrarse en una diversidad de formas de dosificación, incluyendo, aunque sin limitación, soluciones líquidas o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas poliméricas o microvesículas, liposomas y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferente depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

40 Las composiciones indicadas en la presente memoria también incluyen preferentemente portadores farmacéuticamente aceptables convencionales y adyuvantes conocidos de la técnica, tales como la albúmina sérica humana, intercambiadores iónicos, alúmina, lecitina, sustancias tamponadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido ascórbico, sorbato de potasio y sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina.

45 El modo de administración y el régimen de dosificación más eficaces para las composiciones farmacéuticas de la presente invención dependen de la severidad y curso de la enfermedad, de la salud y respuesta al tratamiento del paciente y del criterio del médico responsable. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las dosis de las composiciones deben titularse respecto al paciente individual. Sin embargo, una dosis eficaz de las composiciones de la presente invención generalmente se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 2.000 mg/kg.

50 Las moléculas indicadas en la presente memoria pueden encontrarse en una diversidad de formas de dosificación, incluyendo, aunque sin limitación, soluciones líquidas o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas poliméricas o microvesículas, liposomas y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferente depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

55 La composición que comprende una MUA de la presente invención se formula, se dosifica y se administra de un modo consistente con la buena praxis médica. Entre los factores a considerar en el presente contexto se incluyen la enfermedad o trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por el médico clínico. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista que debe administrarse se encontrará regulada por dichas consideraciones.

60 A modo general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo administrado parenteralmente por dosis se encontrar comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal del paciente al día, encontrándose comprendido el intervalo típico inicial de antagonista utilizado en el intervalo de entre aproximadamente 2 y 10 mg/kg.

En una realización preferente, la MUA es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humanizado. Las dosis adecuadas para dicho anticuerpo no conjugado son, por ejemplo, de entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 1.000 mg/m². En una realización, la dosis del anticuerpo difiere de la recomendada actualmente para el RITUXAN®. Por ejemplo, puede administrarse en el paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² del anticuerpo, por ejemplo en el caso de que la dosis se encuentre comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 250 mg/m², por ejemplo entre aproximadamente 50 mg/m² y aproximadamente 200 mg/m².

Además, puede administrarse una o más dosis iniciales del anticuerpo, seguido de una o más dosis posteriores, en donde la dosis en mg/m² del anticuerpo en la dosis o dosis posteriores excede la dosis en mg/m² del anticuerpo en la dosis inicial o dosis iniciales del anticuerpo. Por ejemplo, la dosis inicial puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 250 mg/m² (por ejemplo entre aproximadamente 50 mg/m² y aproximadamente 200 mg/m²) y la dosis posterior puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 250 mg/m² y aproximadamente 1.000 mg/m².

Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, estas cantidades sugeridas de las MUA se encuentran muy supeditadas al criterio terapéutico. El factor clave en la selección de una dosis y programación apropiadas es el resultado obtenido, tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, pueden resultar necesarias dosis relativamente más altas inicialmente para el tratamiento de enfermedades continuas y agudas. Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o trastorno, el antagonista se administra tan pronto como se observe el primer indicio, diagnóstico, aparición o incidencia de la enfermedad o trastorno, o durante remisiones de la enfermedad o trastorno.

La MUA indicada en la presente memoria se administra mediante cualquier medio, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, por vía intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista puede administrarse convenientemente mediante infusión pulsada, por ejemplo con dosis decrecientes del antagonista. Preferentemente, la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Pueden administrarse otros compuestos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citoquinas con los antagonistas en la presente memoria. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente se deja un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Resulta evidente que la dosis de la composición de la exposición necesaria para conseguir curaciones puede reducirse adicionalmente mediante la optimización de la programación.

Según la práctica de la exposición, el portador farmacéutico puede ser un portador lipídico. El portador lipídico puede ser un fosfolípido. Además, el portador lipídico puede ser un ácido graso. Además, el portador lipídico puede ser un detergente. Tal como se utiliza en la presente memoria, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente reduciéndola.

En un ejemplo de la exposición, el detergente puede ser un detergente no iónico. Entre los ejemplos de detergentes no iónicos se incluyen, aunque sin limitación, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o monooleato de polioxiethylensorbitán), Brij y Triton (por ejemplo Triton WR-1339 y Triton A-20).

Alternativamente, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, aunque sin limitación, bromuro de alquiltrimetilamonio.

Además, según la exposición, el portador lipídico puede ser un liposoma. Tal como se utiliza en la presente solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a membrana que contiene cualquier molécula de la invención o combinaciones de las mismas.

En las realizaciones siguientes, se mencionan aspectos específicos que resultan preferentes:

Ítem 1: un polinucleótido aislado que comprende:

- a. una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7 y
- b. una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23 y
- c. secuencia ID nº 24

Ítem 2: un polinucleótido aislado que comprende SEC ID nº 8, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10.

Ítem 3: un polinucleótido aislado según el ítem 1 ó 2, que codifica un polipéptido de fusión.

Ítem 4: polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 3.

Ítem 5: polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 4.

5 Ítem 6: polinucleótido aislado según el ítem 4 ó 5, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

Ítem 7: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% con la secuencia SEC ID nº 3, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

10 Ítem 8: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% con la secuencia SEC ID nº 4, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

Ítem 9: un polinucleótido aislado que comprende:

a. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 1, y

15 b. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

Ítem 10: un polinucleótido aislado que comprende:

a. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 2, y

20 b. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

Ítem 11: polinucleótido aislado codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 1.

Ítem 12: polinucleótido aislado codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 2.

25 Ítem 13: polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 11.

Ítem 14: polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 12.

Ítem 15: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a la secuencia SEC ID nº 11 o respecto a la secuencia SEC ID nº 12.

30 Ítem 16: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a la secuencia SEC ID nº 11 o respecto a la secuencia SEC ID nº 12.

Ítem 17: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 90% respecto a la secuencia SEC ID nº 11 o respecto a la secuencia SEC ID nº 12.

Ítem 18: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia SEC ID nº 11 o respecto a la secuencia SEC ID nº 12.

35 Ítem 19: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 99% respecto a la secuencia SEC ID nº 11 o respecto a la secuencia SEC ID nº 12.

Ítem 20: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 13 (aminoácidos de cadena pesada).

40 Ítem 21: polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 14 (aminoácidos de cadena ligera).

Ítem 22: un polinucleótido aislado que comprende:

a. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la región VH del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes del mismo, y

45 b. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

Ítem 23: un polinucleótido aislado que comprende:

a. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la región VL del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes del mismo, y

50 b. una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

55 Ítem 24: vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de los ítems 1 a 23.

Ítem 25: vector según el ítem 24, en el que dicho vector es policistrónico.

Ítem 26: una célula huésped que comprende el vector de expresión según el ítem 24.

Ítem 27: una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de los ítems 1 a 23.

60 Ítem 28: un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 murino y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.

Ítem 29: molécula ligante de antígeno que comprende el polipéptido según el ítem 28.

Ítem 30: molécula ligante de antígeno según el ítem 29, que se une a CD20 humano.

Ítem 31: molécula ligante de antígeno según el ítem 29, que es un anticuerpo.

Ítem 32: molécula ligante de antígeno según el ítem 31, que es un anticuerpo quimérico.

65 Ítem 33: molécula ligante de antígeno según el ítem 31, que es un anticuerpo humanizado.

Ítem 34: molécula ligante de antígeno según el ítem 31, que es un anticuerpo primatizado.

Ítem 35: un polipéptido quimérico que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o una variante de la misma.

Ítem 36: un polipéptido quimérico que comprende la secuencia SEC ID nº 2 o una variante de la misma.

Ítem 37: un polipéptido quimérico que comprende:

d. un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 15, SEC ID nº 16 y SEC ID nº 17 y

e. un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 25, SEC ID nº 26 y SEC ID nº 27 y

f. SEC ID nº 28.

Ítem 38: un polipéptido quimérico según el ítem 37, que comprende además un esqueleto de región variable de cadena pesada, en el que dicho esqueleto comprende un residuo alanina en la posición 71, según la numeración Kabat.

Ítem 39: un polipéptido quimérico según el ítem 37, que comprende además un esqueleto de región variable de cadena pesada, en el que dicho esqueleto comprende un residuo arginina en la posición 94, según la numeración Kabat.

Ítem 40: un polipéptido quimérico que comprende la SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20.

Ítem 41: un polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 13 o una variante de la misma.

Ítem 42: un polipéptido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 14 o una variante de la misma.

Ítem 43: el polipéptido aislado según cualquiera de los ítems 35 a 40, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

Ítem 44: una molécula ligante de antígeno que comprende el polipéptido aislado según el ítem 43.

Ítem 45: la molécula ligante de antígeno según el ítem 44, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 46: el anticuerpo según el ítem 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo primatizado.

Ítem 47: el anticuerpo según el ítem 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

Ítem 48: la molécula ligante de antígeno según el ítem 44, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un fragmento de anticuerpo.

Ítem 49: el fragmento de anticuerpo según el ítem 48, en el que dicho fragmento de anticuerpo se ha primatizado.

Ítem 50: la molécula ligante de anticuerpo según el ítem 48, en donde dicho fragmento de anticuerpo se ha humanizado.

Ítem 51: una molécula ligante de antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión de CD20, en la que dicha molécula ligante de anticuerpo es quimérica.

Ítem 52: la molécula ligante de antígeno según el ítem 51, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 53: La molécula ligante de antígeno según el ítem 52, en la que dicho anticuerpo se ha primatizado.

Ítem 54: la molécula ligante de antígeno según el ítem 51, en la que dicho anticuerpo recombinante se ha humanizado.

Ítem 55: la molécula ligante de antígeno según el ítem 51, en la que dicho anticuerpo recombinante comprende una región Fc humana.

Ítem 56: la molécula ligante de antígeno según el ítem 55, en la que dicha región Fc humana es una región Fc de IgG humana.

Ítem 57: una molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 29 a 34 ó 44 a 56, presentando dicha molécula ligante de antígeno una región Fc con oligosacáridos modificados.

Ítem 58: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que dicha región Fc ha sido modificada para presentar un número reducido de residuos de fucosa en comparación con la molécula ligante de antígeno no modificada.

Ítem 59: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que dicha región Fc presenta una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados.

Ítem 60: una molécula ligante de antígeno según el ítem 59, en la que dichos oligosacáridos modificados son bisectados complejos.

Ítem 61: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que dichos oligosacáridos modificados presentan una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicha molécula ligante de antígeno.

Ítem 62: una molécula ligante de antígeno según el ítem 61, en la que dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos.

Ítem 63: una molécula ligante de antígeno según el ítem 61, en la que dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos.

Ítem 64: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 65: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 66: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 67: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 68: un método para producir una molécula ligante de antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 humano, y en el que dicha molécula ligante de antígeno es quimérica, comprendiendo dicho método:

- a. cultivar la célula huésped según el ítem 26 ó 27 en un medio bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido codificante de dicha molécula ligante de antígeno, y
- b. recuperar dicha molécula ligante de antígeno a partir del cultivo resultante.

Ítem 69: el método según el ítem 68, en el que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 70: una composición farmacéutica que comprende la molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 29 a 34 ó 46 a 67 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Ítem 71: la composición farmacéutica según el ítem 70, en la que dicha composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

Ítem 72: la composición farmacéutica según el ítem 70, en la que dicha composición comprende además un adyuvante.

Ítem 73: un método de tratamiento de un trastorno tratable mediante la reducción marcada de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 70 a 72 en un sujeto humano que lo necesita.

Ítem 74: una célula huésped manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en un nivel suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 44 a 67.

Ítem 75: la célula huésped según el ítem 74, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

Ítem 76: la célula huésped según el ítem 74, en donde dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 77: la célula huésped según el ítem 74, en donde dicha molécula ligante de antígeno es un fragmento de anticuerpo.

Ítem 78: la célula huésped según el ítem 74, en donde dicha molécula ligante de antígeno comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

Ítem 79: la célula huésped según el ítem 74, en la que dicha molécula ligante de antígeno producida por dicha célula huésped muestra una afinidad de unión a receptores Fc incrementada como resultado de dicha modificación.

Ítem 80: la célula huésped según el ítem 74, en donde dicha molécula ligante de antígeno producida por dicha célula huésped muestra una función efectora incrementada como resultado de dicha modificación.

Ítem 81: una célula huésped según el ítem 75, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

Ítem 82: una célula huésped según el ítem 75, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

Ítem 83: una célula huésped según el ítem 82, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II.

Ítem 84: una célula huésped según el ítem 82, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

Ítem 85: una célula huésped según el ítem 82, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

Ítem 86: una célula huésped según el ítem 82, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa I.

Ítem 87: una célula huésped según el ítem 82, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\alpha(1-6)$ fucosiltransferasa nuclear.

Ítem 88: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada.

Ítem 89: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a las células NK.

Ítem 90: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a macrófagos.

Ítem 91: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a las células polimorfonucleares.

Ítem 92: una célula huésped según el ítem 80, en la que dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a monocitos.

Ítem 93: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la señalización directa inductora de apoptosis incrementada.

Ítem 94: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es la maduración de células dendríticas incrementada.

Ítem 95: una célula huésped según el ítem 80, en donde dicha función efectora incrementada es el cebado incrementado de las células T.

Ítem 96: una célula huésped según el ítem 79, en donde dicho receptor Fc es el receptor activador Fcγ.

Ítem 97: una célula huésped según el ítem 79, en la que dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIA.

Ítem 98: una célula huésped según el ítem 74, en la que dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma

Ítem 99: la célula huésped según el ítem 74, que comprende además por lo menos un polinucleótido transfectado codificante de un polipéptido según cualquiera de los ítems 28 y 35 a 41, y en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia codificante de una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

Ítem 100: la célula huésped según el ítem 74, en la que dicho ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III se encuentra operablemente ligado a un elemento promotor constitutivo.

Ítem 101: la célula huésped según el ítem 100, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

Ítem 102: un método para producir una molécula ligante de antígeno que presenta oligosacáridos modificados en una célula huésped, comprendiendo dicho método:

a. cultivar una célula huésped para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permiten la producción de dicha molécula ligante de antígeno, y que permiten la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha molécula ligante de antígeno, y

b. aislar dicha molécula ligante de antígeno, en la que dicha molécula ligante de antígeno es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 y en la que dicha molécula ligante de antígeno o fragmento de la misma es quimérica.

Ítem 103: un método según el ítem 102, en el que dichos oligosacáridos modificados presentan un nivel reducido de fucosilación en comparación con los oligosacáridos no modificados.

Ítem 104: un método según el ítem 102, en el que dichos oligosacáridos modificados son híbridos.

Ítem 105: un método según el ítem 102, en el que dichos oligosacáridos modificados son complejos.

Ítem 106: un método según el ítem 102, en el que dicho anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por dicha célula huésped presenta una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicho polipéptido.

Ítem 107: un método según el ítem 106, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos.

Ítem 108: un método según el ítem 106, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos.

Ítem 109: un método según el ítem 102, en donde por lo menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 110: un método según el ítem 102, en el que por lo menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 111: un método según el ítem 102, en el que por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 112: una molécula ligante de antígeno manipulada para que presenta una función efectora incrementada, producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111.

Ítem 113: la molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 114: un anticuerpo manipulado para que presente una afinidad ligante de receptores Fc incrementada, producido mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111.

Ítem 115: la molécula ligante de antígeno según el ítem 114, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 116: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada.

Ítem 117: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es unión a célula NK incrementada.

Ítem 118: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es unión a macrófagos incrementada.

Ítem 119: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es unión a monocitos incrementada.

Ítem 120: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es unión incrementada a células polimorfonucleares.

Ítem 121: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es la señalización directa inductora de apoptosis.

Ítem 122: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es la maduración incrementada de las células dendríticas.

Ítem 123: una molécula ligante de antígeno según el ítem 112, en la que dicha función efectora incrementada es el cebado incrementado de las células T.

- Ítem 124: una molécula ligante de antígeno según el ítem 114, en la que dicho receptor Fc es receptor activador Fc.
- Ítem 125: una molécula ligante de antígeno según el ítem 114, en la que dicho receptor Fc es receptor activador FcγRIIIa.
- 5 Ítem 126: una molécula ligante de antígeno producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111, en donde dicha molécula ligante de antígeno es un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc y manipulado para que presente una función efectora incrementada.
- 10 Ítem 127: una molécula ligante de antígeno producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111, en donde dicha molécula ligante de antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 1 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para que presente una función efectora incrementada.
- 15 Ítem 128: Una molécula ligante de anticuerpo producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111, en donde dicha molécula ligante de antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para que presente una función efectora incrementada.
- 20 Ítem 129: una molécula ligante de antígeno producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111, en donde dicha molécula ligante de antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 3 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para que presente una función efectora incrementada.
- 25 Ítem 130: una molécula ligante de antígeno producida mediante el método según cualquiera de los ítems 102 a 111, en donde dicha molécula ligante de antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y manipulada para que presente una función efectora incrementada.
- 30 Ítem 131: una composición farmacéutica que comprende la molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 112 a 130 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- Ítem 132: una composición farmacéutica que comprende la molécula ligante de antígeno según el ítem 126 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 Ítem 133: una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión según cualquiera de los ítems 127 a 130 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- Ítem 134: un método para tratar una enfermedad tratable mediante reducción marcada de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 112 a 130 en un sujeto humano que lo necesita.
- 40 Ítem 135: un polinucleótido aislado según el ítem 4 ó 5, que comprende además una secuencia codificante de una región constante de cadena ligera o pesada de anticuerpo humano.
- Ítem 136: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% con la secuencia SEC ID nº 24, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
- 45 Ítem 137: una célula huésped que coexpresa un polinucleótido aislado según el ítem 136 y un polinucleótido que comprende una secuencia codificante de la región variable de una cadena ligera de anticuerpo.
- Ítem 138: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 50% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.
- 50 Ítem 139: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 60% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.
- Ítem 140: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.
- 55 Ítem 141: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 80% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.
- Ítem 142: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 90% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.
- 60 Ítem 143: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 50% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.
- Ítem 144: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 60% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.
- 65 Ítem 145: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.
- Ítem 146: una molécula ligante de antígeno según el ítem 57, en la que por lo menos 75% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.
- Ítem 147: un método según el ítem 73, en el que dicho trastorno es un linfoma de células B.
- Ítem 148: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71.

Ítem 149: un polinucleótido aislado según el ítem 148, en el que dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID nº 31.

Ítem 150: un polinucleótido aislado según el ítem 148, en el que dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID nº 55.

5 Ítem 151: un polinucleótido aislado según el ítem 148, en el que dicho polinucleótido aislado comprende la SEC ID nº 59.

Ítem 152: un polinucleótido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 75.

Ítem 153: Un polinucleótido aislado según el ítem 148 ó 149, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

10 Ítem 154: un polinucleótido aislado que comprende:

a) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 32, SEC ID nº 56 y SEC ID nº 60, y

b) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76.

15 Ítem 155: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

Ítem 156: Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% con la secuencia SEC ID nº 75, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

20 Ítem 157: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71.

25 Ítem 158: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a la secuencia SEC ID nº 75.

30 Ítem 159: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 90% respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71.

35 Ítem 160: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 90% respecto a la secuencia SEC ID nº 75.

40 Ítem 161: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71.

45 Ítem 162: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia SEC ID nº 75.

Ítem 163: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 99% respecto a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33, SEC ID nº 35, SEC ID nº 37, SEC ID nº 39, SEC ID nº 41, SEC ID nº 43, SEC ID nº 45, SEC ID nº 47, SEC ID nº 49, SEC ID nº 51, SEC ID nº 53, SEC ID nº 55, SEC ID nº 57, SEC ID nº 59, SEC ID nº 61, SEC ID nº 63, SEC ID nº 65, SEC ID nº 67, SEC ID nº 69 y SEC ID nº 71.

50 Ítem 164: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 99% respecto a la secuencia SEC ID nº 75.

Ítem 165: un polinucleótido aislado que comprende:

55 a) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, y

60 b) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

Ítem 166: un polinucleótido aislado que comprende:

65 a) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76, y

b) una secuencia codificante de un polipéptido que presenta la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento del mismo, de una especie que no es el ratón.

- Ítem 167: un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72. Ítem 168: un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76.
- Ítem 169: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72.
- Ítem 170: un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que presenta la secuencia SEC ID nº 76.
- Ítem 171: un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de los ítems 148 a 170.
- Ítem 172: el vector según el ítem 171, en el que dicho vector es policistrónico.
- Ítem 173: una célula huésped que comprende el vector de expresión según el ítem 171.
- Ítem 174: una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado según cualquiera de los ítems 148 a 170.
- Ítem 175: un polipéptido humanizado que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, o una variante de las mismas. Ítem 176: un polipéptido humanizado que comprende la secuencia SEC ID nº 76 o una variante de la misma.
- Ítem 177: un polipéptido aislado codificante de una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 30, SEC ID nº 32, SEC ID nº 34, SEC ID nº 36, SEC ID nº 38, SEC ID nº 40, SEC ID nº 42, SEC ID nº 44, SEC ID nº 46, SEC ID nº 48, SEC ID nº 50, SEC ID nº 52, SEC ID nº 54, SEC ID nº 56, SEC ID nº 58, SEC ID nº 60, SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, o una variante de las mismas.
- Ítem 178: un polipéptido aislado que comprende la secuencia SEC ID nº 76 o una variante de la misma.
- Ítem 179: el polipéptido aislado según cualquiera de los ítems 177 a 178, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.
- Ítem 180: una molécula ligante de antígeno que comprende el polipéptido aislado según el ítem 179.
- Ítem 181: la molécula ligante de antígeno según el ítem 180, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.
- Ítem 182: el anticuerpo según el ítem 181, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- Ítem 183: la molécula ligante de antígeno según el ítem 180, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un fragmento de anticuerpo.
- Ítem 184: la molécula ligante de anticuerpo según el ítem 183, en la que dicho fragmento de anticuerpo se ha humanizado.
- Ítem 185: la molécula ligante de antígeno según el ítem 180, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo recombinante.
- Ítem 186: la molécula ligante de antígeno según el ítem 185, en la que dicho anticuerpo recombinante se ha humanizado.
- Ítem 187: la molécula ligante de antígeno según el ítem 180, en la que dicho anticuerpo recombinante comprende una región Fc humana.
- Ítem 188: la molécula ligante de antígeno según el ítem 187, en la que dicha región Fc humana es una región Fc de IgG humana.
- Ítem 189: una molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 180 a 188, presentando dicha molécula ligante de antígeno una región Fc con oligosacáridos modificados.
- Ítem 190: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que dicha región Fc ha sido modificada para presentar un número reducido de residuos de fucosa en comparación con la molécula ligante de antígeno no modificada.
- Ítem 191: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que dicha región Fc presenta una proporción incrementada de oligosacáridos bisectados.
- Ítem 192: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que dichos oligosacáridos modificados son bisectados complejos.
- Ítem 193: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que dichos oligosacáridos modificados presentan una proporción incrementada de oligosacáridos no fucosilados bisectados en la región Fc de dicha molécula ligante de antígeno.
- Ítem 194: una molécula ligante de antígeno según el ítem 193, en la que dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos.
- Ítem 195: una molécula ligante de antígeno según el ítem 193, en la que dichos oligosacáridos no fucosilados bisectados son complejos.

Ítem 196: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 197: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

5 Ítem 198: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

Ítem 199: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados bisectados.

10 Ítem 200: un método para producir una molécula ligante de antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para la unión a CD20 humano, y en el que dicha molécula ligante de antígeno es quimérica, comprendiendo dicho método:

a) cultivar la célula huésped según el ítem 173 ó 174 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido codificante de dicha molécula ligante de antígeno, y

15 b) recuperar dicha molécula ligante de antígeno.

Ítem 201: el método según el ítem 200, en el que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 202: el método según el ítem 200, en el que dicha molécula ligante de antígeno quimérico se ha humanizado.

20 Ítem 203: una composición farmacéutica que comprende la molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 189 a 199 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Ítem 204: la composición farmacéutica según el ítem 203, en la que dicha composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Ítem 205: la composición farmacéutica según el ítem 203, en la que dicha composición comprende además un adyuvante.

Ítem 206: un método de tratamiento de un trastorno tratable mediante la reducción marcada de las células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 203 a 205 en un sujeto humano que lo necesita.

30 Ítem 207: una célula huésped manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en un nivel suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de un polipéptido producido por dicha célula huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula ligante de antígeno según cualquiera de los ítems 180 a 197.

Ítem 208: la célula huésped según el ítem 207, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

35 Ítem 209: la célula huésped según el ítem 207, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo.

Ítem 210: la célula huésped según el ítem 207, en donde dicha molécula ligante de antígeno es un fragmento de anticuerpo.

Ítem 211: la célula huésped según el ítem 207, en donde dicha molécula ligante de antígeno comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

40 Ítem 212: la célula huésped según el ítem 207, en la que dicha molécula ligante de antígeno producida por dicha célula huésped muestra una afinidad de unión a receptores Fc incrementada como resultado de dicha modificación.

Ítem 213: la célula huésped según el ítem 207, en donde dicha molécula ligante de antígeno producida por dicha célula huésped muestra una función efectora incrementada como resultado de dicha modificación.

45 Ítem 214: una célula huésped según el ítem 208, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

Ítem 215: una célula huésped según el ítem 208, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

50 Ítem 216: una célula huésped según el ítem 215, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa II.

Ítem 217: una célula huésped según el ítem 215, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

Ítem 218: una célula huésped según el ítem 215, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

55 Ítem 219: una célula huésped según el ítem 215, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la manosidasa I.

Ítem 220: una célula huésped según el ítem 215, en donde dicho dominio de localización en Golgi es el dominio de localización de la $\alpha(1-6)$ fucosiltransferasa nuclear.

60 Ítem 221: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la citotoxicidad celular mediada por Fc incrementada.

Ítem 222: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a las células NK.

Ítem 223: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a macrófagos.

65

Ítem 224: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a las células polimorfonucleares.

Ítem 225: una célula huésped según el ítem 213, en la que dicha función efectora incrementada es la unión incrementada a monocitos.

5 Ítem 226: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la señalización directa inductora de apoptosis incrementada.

Ítem 227: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es la maduración de células dendríticas incrementada.

10 Ítem 228: una célula huésped según el ítem 213, en donde dicha función efectora incrementada es el cebado incrementado de las células T.

Ítem 229: una célula huésped según el ítem 212, en donde dicho receptor Fc es el receptor activador Fcγ.

Ítem 230: una célula huésped según el ítem 212, en la que dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIA.

15 Ítem 231: una célula huésped según el ítem 207, en la que dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma

Ítem 232: la célula huésped según el ítem 207, que comprende además por lo menos un polinucleótido transfectado codificante de un polipéptido según cualquiera de los ítems 28 y 35 a 41, y en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia codificante de una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

20 Ítem 233: la célula huésped según el ítem 207, en la que dicho ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III se encuentra operablemente ligado a un elemento promotor constitutivo.

Ítem 234: la célula huésped según el ítem 233, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

25 Ítem 235: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 50% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

Ítem 236: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 60% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

30 Ítem 237: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

Ítem 238: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 80% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

Ítem 239: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 90% de los oligosacáridos en la región Fc son bisectados.

35 Ítem 240: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 50% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

Ítem 241: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 60% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

40 Ítem 242: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 70% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

Ítem 243: una molécula ligante de antígeno según el ítem 189, en la que por lo menos 75% de los oligosacáridos en la región Fc son no fucosilados.

Ítem 244: un método según el ítem 206, en el que dicho trastorno es un linfoma de células B.

45 Ítem 245: un polinucleótido aislado que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada de la misma que contiene por lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

Ítem 246: un polinucleótido aislado según el ítem 245, en donde dicha región determinante de complementariedad se selecciona de entre el grupo que consiste en: [LIST ALL B-Ly1 CDR SEQUENCES].

50 Ítem 247: un polinucleótido aislado según el ítem 245, en el que dicho polinucleótido aislado codifica una molécula ligante de antígeno.

Ítem 248: un polinucleótido aislado que comprende por lo menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas del mismo, que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad de cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

55 Ítem 249: un polipéptido aislado según el ítem 248, en el que dichas regiones determinantes de complementariedad comprenden por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7 y por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23 y SEC ID nº 24, o variantes o formas truncadas de dichas secuencias que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad de cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

60 Ítem 250: un polipéptido aislado codificado por los polinucleótidos aislados según cualquiera de los ítems 249 a 249.

65 Ítem 251: una molécula ligante de antígeno que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada de la misma que contiene por

lo menos los residuos determinantes de especificidad de dicha región determinante de complementariedad y que comprende además una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.

Ítem 252: una molécula ligante de antígeno según el ítem 251, en la que dicha molécula ligante de antígeno comprende por lo menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes o formas truncadas de las mismas que contienen por lo menos los residuos determinantes de especificidad de cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

Ítem 253: una molécula ligante de antígeno según el ítem 252, en la que dicha molécula ligante de antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo.

Ítem 254: una molécula ligante de antígeno según el ítem 252, en la que dicha molécula ligante de antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado.

Ítem 255: un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado que presenta una ADCC incrementada como resultado de dicha manipulación, sin pérdida de la capacidad de inducir apoptosis de las células diana.

Ítem 256: un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado según el ítem 256, en el que dicho anticuerpo ha sido manipulado para que presente un patrón alterado de glucosilación en la región Fc.

Ítem 257: un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado según el ítem 255, en el que dicha glucosilación alterada es un incremento de la cantidad de oligosacáridos complejos bisectados.

Ítem 258: un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado según el ítem 256, en el que dicha glucosilación alterada es una reducción de la cantidad de residuos de fucosa.

Ítem 259: un anticuerpo anti-CD20 de tipo II manipulado según el ítem 255, en el que dicho anticuerpo ha sido manipulado para que presente una secuencia de aminoácidos alterada en la región Fc.

Los ejemplos, posteriormente, explican la invención en mayor detalle. Las preparaciones y ejemplos siguientes se proporcionan para permitir que el experto en la materia entienda más claramente y ponga en práctica la invención.

EJEMPLOS

[NOTA: A menos que se indique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos aminoácidos en los Ejemplos, a continuación, siguen el sistema de numeración de Kabat].

EJEMPLO 1

Materiales y métodos:

Clonación y expresión del anticuerpo B-Ly1 recombinante

Se cultivaron células de hibridoma que expresaban B-Ly1, en RPMI que contenía FBS al 10% y L-glutamina 4 mM. Se recolectaron 6×10^6 células con una viabilidad $>90\%$ y se aisló el ARN total utilizando un kit Qiagen RNeasy midi. Los ADNc codificantes de las cadenas ligera y pesada variables de B-Ly1 se amplificaron por RT-PCR. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando las condiciones siguientes: 30 minutos a 50°C para la síntesis de la primera cadena de ADNc, 15 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C , 1 minuto a 45°C , 1,5 minutos a 72°C , y una etapa de elongación final de 10 minutos a 72°C . El tamaño esperado de los productos de PCR se confirmó mediante electroforesis en gel. Los productos de PCR se clonaron en vectores de *E. coli* adecuados y la secuenciación del ADN confirmó que se habían aislado los genes codificantes de las cadenas ligera y pesada variables.

Para la construcción de los vectores de expresión de B-Ly1 quiméricos, se fusionaron secuencias de señal sintéticas y sitios de restricción apropiados a las cadenas variables mediante reacciones de PCR adicionales. Tras una confirmación final de la secuencia de ADN correcta de las cadenas variables, se combinaron con las regiones constantes de la IgG1 humana correspondiente. Tras construir los genes, se clonaron bajo el control del promotor MPSV y cadena arriba de un sitio poliA sintético, utilizando dos vectores separados, uno para cada cadena, resultando en los plásmidos pETR1808 (vector de expresión de cadena pesada) y pETR1813 (vector de expresión de cadena ligera). Cada vector portaba una secuencia OriP del VEB.

Se produjo B-Ly1 quimérico mediante cotransfección de células HEK293-EBNA con los vectores pETR1808 y pETR1813 utilizando un enfoque de transfección con fosfato de calcio. Se transfectaron células HEK293-EBNA de crecimiento exponencial mediante el método del fosfato de calcio. Las células se cultivaron como cultivos monocapa adherentes en matraces T utilizando medio de cultivo DMEM complementado con FCS al 10%, y se transfectaron una vez habían alcanzado una confluencia de entre 50% y 80%. Para la transfección de un matraz T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% v/v final), 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de neomicina y las células se introdujeron a 37°C en un incubador con una atmósfera de 5% de CO_2 durante la noche. Para la transfección de cada matraz T75, se preparó una solución de ADN, CaCl_2 y agua mediante la mezcla de 47 μg de ADN total de vector plásmido dividido igualmente entre los vectores de expresión de cadena ligera y de cadena pesada, 235 μl de una solución de CaCl_2 1 M, y adición de agua hasta un volumen final de 469 μl . A esta solución se añadieron 469 μl de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, solución de Na_2HPO_4 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM suplementado

con FCS al 2%, y se añadió a T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂, durante aproximadamente 17 a 20 horas, después el medio se sustituyó con 12 ml de DMEM, FCS al 10%. Para la producción de anticuerpo no modificado "chB-Ly1", las células se transfectaron únicamente con vectores de expresión de los anticuerpo pETR1808 y pETR1813 en una proporción 1:1. Para la producción del anticuerpo glucomanipulado "chB-LY1-ge", las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión de anticuerpos (pETR1808 y pETR1813), uno para la expresión de polipéptido GnTIII de fusión (pETR1519) y uno para la expresión de manosidasa II (pCLF9) a una proporción de 4:4:1:1, respectivamente. El día 5 después de la transfección, se recolectó el sobrenadante, se centrifugó durante 5 minutos a 1.200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 minutos a 4.000 rpm y se almacenó a 4°C.

Se purificó chB-Ly1 y chB-Ly1-ge a partir del sobrenadante de cultivo utilizando tres etapas cromatográficas secuenciales, cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico y una etapa de cromatografía por exclusión de tamaños en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando el tampón por solución salina tamponada con fosfato y recogiendo el pico de anticuerpo monomérico de esta última etapa. Se estimó la concentración de anticuerpo utilizando un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 280 nm.

Análisis de oligosacáridos

Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, encontrándose los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución.

La solución digerida resultante que contenía los oligosacáridos liberados se preparó directamente para el análisis de EM MALDI/TOF o se digirió adicionalmente con glucosidasa EndoH antes de la preparación de las muestras para el análisis de EM MALDI/TOF.

Se liberaron enzimáticamente los oligosacáridos de los anticuerpos mediante digestión con PNGasaF, encontrándose los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución.

Se humectaron los pocillos de una placa de 96 pocillos preparada con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) con 100 µl de metanol y el líquido se pasó a través de la membrana de PVDF utilizando vacío aplicado al colector de vacío Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 µl de agua. A continuación, los pocillos se lavaron con 50 µl de tampón RCM (urea 8 M, Tris 360 mM, EDTA 3,2 mM, pH 8,6). Se cargaron entre 30 y 40 µg de anticuerpo en un pocillo que contenía 10 µl de tampón RCM. El líquido en el pocillo se pasó a través de la membrana mediante la aplicación de un vacío, y la membrana posteriormente se lavó dos veces con 50 µl de tampón RCM. La reducción de los puentes disulfuro se llevó a cabo mediante la adición de 50 µl de ditiotreitól 0,1 M en RCM e incubación a 37°C durante 1 hora.

Tras la reducción, se aplicó un vacío para eliminar la solución de ditiotreitól del pocillo. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de agua antes de llevar a cabo la carboximetilación de los residuos de cisteína mediante la adición de 50 µl de ácido yodoacético 0,1 M en tampón RCM y la incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

Tras la carboximetilación, se aspiraron los pocillos con vacío y posteriormente se lavaron tres veces con 300 µl de agua. A continuación, se bloqueó la membrana de PVDF para evitar la adsorción de la endoglucosidasa, mediante la incubación de 100 µl de una solución acuosa al 1% de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se eliminó el reactivo de bloqueo mediante vacío suave seguido de tres lavados con 300 µl de agua.

Los oligosacáridos N-ligados se liberaron mediante la adición de 2,5 mU de péptido-N-glucosidasa F (N-glicanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0,1 mU de sialidasa (GLYKO, Novato, CA) para eliminar cualquier residuo monosacárido cargado potencial, en un volumen final de 25 µl en NaHCO₃ 20 mM, pH 7,0). Se llevó a cabo la digestión durante 3 horas a 37°C.

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución

Se mezclaron entre 40 y 50 µg de anticuerpo con 2,5 mU de PNGasaF (Glyko, U.S.A.) en Tris 2 mM, pH 7,0, en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C.

Utilización de la digestión con endoglucosidasa H de oligosacáridos liberados con PNGasaF para la asignación de estructuras de oligosacáridos biantenarios híbridos a los picos de oligosacáridos neutros en EM-MALDI/TOF.

Los oligosacáridos liberados con PNGasaF se digirieron posteriormente con endoglucosidasa H (EC 3.2.1.96). Para la digestión con EndoH, se añadieron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) al digerido con PNGasaF (método de anticuerpo en solución, anteriormente), proporcionando un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C. La EndoH corta entre los residuos de N-acetilglucosamina del núcleo quitobiosa de los

oligosacáridos N-ligados. El enzima únicamente puede digerir oligomanosa y la mayoría de glicanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no resultan hidrolizados.

Preparación de muestras para EM-MALDI/TOF

Se incubaron los digeridos enzimáticos que contenían los oligosacáridos liberados durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente tras la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y posteriormente se pasaron a través de 0,6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100 a 200, BioRad, Suiza) empaquetada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para eliminar los cationes y las proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa diana de acero inoxidable y se mezcló en la placa con 1 µl de matriz sDHB. La matriz sDHB se preparó mediante la disolución de 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro sódico acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 µl de etanol y las muestras finalmente se dejaron recristalizar al aire.

EM-MALDI/TOF

El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para obtener los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20 kV y un retardo de 80 ns. Se realizó una calibración externa con estándares oligosacáridos para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 pulsos de láser se sumaron para obtener el espectro final.

Reducción marcada de las células B de sangre completa

Se distribuyeron alícuotas de 495 µl de sangre heparinizada de un donante sano en tubos de poliestireno de 5 ml; se añadieron 5 µl de muestras de anticuerpo concentradas 100 veces (concentración final: 1 a 1.000 ng/ml) o de PBS, y los tubos se incubaron a 37°C. Tras 24 horas, se transfirieron 50 µl de sangre a un tubo nuevo y se tiñeron con anti-CD3-FITC, anti-19-PE y anti-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Antes del análisis, se añadieron 500 µl de tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y EDTA 5 mM) a los tubos. La fluorescencia de CD3-FITC y de CD19-PE de las muestras de sangre se analizó mediante citometría de flujo fijando un umbral en CD45-CyChrome. Se determinó la reducción marcada de las células B dibujando un gráfico de la proporción entre células B CD19⁺ y células T CD3⁺.

Unión de los anticuerpos anti-CD20 a células Raji

Se transfirieron 500.000 en 180 µl de tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y EDTA 5 mM) a 5 ml de tubos de poliestireno y se añadieron 20 µl de muestra de anticuerpo anti-CD20 concentrado 10 veces (concentración final: 1 a 5.000 ng/ml) o PBS solo, y los tubos se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron las muestras dos veces con tampón FACS y se peletizaron a 300xg durante 3 minutos. Se separó el sobrenadante mediante aspiración y se introdujeron las células en 100 µl de tampón FACS y 1 µl de fragmentos F(ab')₂-FITC específicos anti-Fc (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) y los tubos se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se introdujeron en 500 µl de tampón FACS que contenía 0,5 µg/ml de PI para el análisis mediante citometría de flujo. La unión se determinó dibujando un gráfico de la media geométrica de la fluorescencia frente a las concentraciones de anticuerpo.

EJEMPLO 2

Enfoque de aceptor de homología elevada

Se llevó a cabo una búsqueda del marco de anticuerpo aceptor de homología elevada mediante el alineamiento de la secuencia de la proteína B-Ly1 de ratón con una colección de secuencias de línea germinal humana y seleccionando la secuencia humana que mostraba la identidad de secuencia más elevada. En este análisis se seleccionó la secuencia VH1_10 de la base de datos VBase como la secuencia de marco aceptor de cadena pesada, y se seleccionó la secuencia VK_2_40 como el marco aceptor para la cadena ligera. En estos dos marcos aceptores se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de los dominios variables de cadenas pesada y ligera de ratón. Debido a que la región del marco 4 no es parte de la región variable del gen V de la línea germinal, el alineamiento para esta posición se realizó individualmente. Se seleccionó la región JH4 para la cadena pesada, y se seleccionó la región JK4 para la cadena ligera. El modelado molecular del dominio de inmunoglobulina diseñado reveló un punto que potencialmente requería los residuos aminoácidos murinos en lugar de los humanos en el exterior de la CDR. La reintroducción de residuos aminoácidos murinos en el marco humano generaría las denominadas retromutaciones. Por ejemplo, el residuo aminoácido aceptor humano en la posición Kabat 27 se retromutó a un residuo tirosina. Se diseñaron variantes de anticuerpo humanizado que incluían u omitían las retromutaciones. La cadena ligera de anticuerpo humanizado no requirió ninguna retromutación. Tras diseñar las secuencias de las proteínas, se sintetizaron las secuencias de ADN codificantes de estas proteínas, tal como se detalla posteriormente.

Enfoque de marco mixto

Con el fin de evitar la introducción de retromutaciones en posiciones de residuos aminoácidos críticos (críticos para conservar una buena afinidad de unión a antígeno o funciones del anticuerpo) del marco aceptor humano, se investigó si podían sustituirse la región marco 1 completa (FR1) o las regiones marco 1 (FR1) y 2 (FR2) por secuencias de anticuerpo humano que ya presentaban los residuos donantes, o residuos funcionalmente equivalentes, en aquellas posiciones importantes en la secuencia de la línea germinal humana natural. Con este fin, se alinearon individualmente los marcos 1 y 2 de VH de la secuencia de B-Ly1 de ratón con las secuencias de la línea germinal humana. No resultaba importante la identidad de secuencia más elevada y no se utilizó para seleccionar los marcos aceptores, sino que, por el contrario, se supuso que resultaba más importante hacer corresponder varios residuos críticos. Aquellos residuos críticos comprendían los residuos 24, 71 y 94 (numeración Kabat) y también aquellos residuos en las posiciones 27, 28 y 30 (numeración Kabat), que se encuentran fuera de la definición de CDR1 según Kabat, sino que con frecuencia se encuentran implicados en la unión de antígenos. La secuencia IMGT de VH3_3_15 se seleccionó como una adecuada. Tras diseñar las secuencias de las proteínas, se sintetizaron las secuencias de ADN codificantes de estas proteínas, tal como se detalla posteriormente. Utilizando este enfoque, no resultaron necesarias retromutaciones ni para la cadena ligera ni para la cadena pesada para conservar buenos niveles de unión a antígenos.

Síntesis de los genes de anticuerpo

Tras diseñar la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humanizado, debía generarse la secuencia de ADN. Se encontraron los datos de secuencias de ADN de las regiones marco individuales en las bases de datos de secuencias de línea germinal humanas. Se obtuvo la secuencia de ADN de las regiones CDR de los datos de ADNc murino correspondiente. Con estas secuencias, se ensambló virtualmente la secuencia completa de ADN. Con estos datos de secuencia de ADN, se introdujeron sitios de restricción diagnósticos en la secuencia virtual, mediante la introducción de mutaciones silenciosas, creando sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena de ADN física, se llevó a cabo la síntesis génica (por ejemplo Wheeler et al., 1995). En este método, se diseñaron oligonucleótidos a partir de genes de interés, de manera que, se derivó una serie de oligonucleótidos a partir de la cadena codificante y otra serie a partir de la cadena no codificante. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último en la fila) siempre muestran secuencias complementarias a dos cebadores derivados de la cadena opuesta. Al introducir estos oligonucleótidos en un tampón de reacción adecuado para cualquier polimerasa termoestable, y añadir Mg^{2+} , dNTPs y una ADN polimerasa, se extendió cada oligonucleótido desde su extremo 3'. El extremo 3' recién formado de un cebador seguidamente se hibridó con el siguiente cebador de la cadena opuesta, y extiende su secuencia adicionalmente bajo condiciones adecuadas para la elongación de la cadena de ADN dependiente de molde. El producto final se clonó en un vector convencional para la propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpos

Se añadieron secuencias líder de cadenas pesada y ligera humanas (para la secreción) cadena arriba de las secuencias de región variable anteriormente indicadas y éstas seguidamente se unieron cadena arriba de las secuencias de cadenas pesada y ligera constantes kappa de IgG1 humana, respectivamente, utilizando técnicas estándares de biología molecular. Las secuencias de ADN de cadenas pesada y ligera de anticuerpo completo se subclonaron en vectores de expresión de mamífero (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y cadena arriba del sitio poliA sintético, conteniendo cada vector una secuencia OriP del VEB, tal como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. Se produjeron anticuerpos tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, anteriormente, es decir, mediante cotransfección de HEK293-EBNA con los vectores de expresión de cadenas pesada y ligera de anticuerpo de mamífero, recolectando el medio de cultivo condicionado 5 a 7 días después de la transfección y purificando los anticuerpos secretados mediante cromatografía de afinidad de proteína A, seguido de cromatografía de intercambio catiónico y una etapa cromatográfica final de exclusión por tamaño para aislar los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. Los anticuerpos se formularon en fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 125 mM, solución de glicina 100 mM de pH 6,7. Las variantes glucomanipuladas de las variantes de anticuerpo humanizado se produjeron mediante cotransfección de los vectores de expresión de anticuerpo conjuntamente con un vector de expresión de glucosiltransferasa GnT-III, o conjuntamente con un vector de expresión GnT-III más un vector de expresión de manosidasa II del Golgi, tal como se describe para el anticuerpo quimérico en el Ejemplo 1, anteriormente. Se purificaron los anticuerpos glucomanipulados y se formularon tal como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos no glucomanipulados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizaron mediante EM-MALDI/TOF tal como se indica posteriormente.

Análisis de oligosacáridos

Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución. Se mezclaron entre 40 y 50 μ g de anticuerpo con 2,5 mU de PNGasaF (Glyko, U.S.A.) en Tris 2 mM, pH 7,0, en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C.

Preparación de muestras para EM-MALDI/TOF

Se incubaron los digeridos enzimáticos que contenían los oligosacáridos liberados durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente tras la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y posteriormente se pasaron a través de 0,6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100 a 200, BioRad, Suiza) empaquetada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para eliminar los cationes y las proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa diana de acero inoxidable y se mezcló en la placa con 1 μ l de matriz sDHB. La matriz sDHB se preparó mediante la disolución de 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro sódico acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 μ l de etanol y las muestras finalmente se dejaron recristalizar al aire.

EM-MALDI/TOF

El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para obtener los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20 kV y un retardo de 80 ns. Se realizó una calibración externa con estándares oligosacáridos para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 pulsos de láser se sumaron para obtener el espectro final.

Ensayo de unión de antígenos

Las variantes de anticuerpo humanizado monomérico purificado se sometieron a ensayo para la unión a CD20 humano en células diana de linfoma de células B Raji utilizando un ensayo de tipo citometría de flujo, tal como se ha descrito para el anticuerpo B-Ly1 quimérico en el Ejemplo 1, anteriormente.

Unión de glucovariantes de IgG1 monomérico a células NK y línea celular CHO que expresa Fc γ RIIIA

Se aislaron células NK humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recién aisladas aplicando una selección negativa enriqueciendo para las células positivas para CD16 y para CD56 (MACS System, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Alemania). La pureza determinada a partir de la expresión de CD56 se encontraba comprendida entre 88% y 95%. Se incubaron en PBS sin iones de calcio ni de magnesio (3×10^5 células/ml) células NK recién aisladas durante 20 minutos a 37°C para eliminar las IgG asociadas a células NK. Las células se incubaron a una densidad de 10⁶ células/ml a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD20 (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 μ g/ml) en PBS, BSA al 0,1%). Tras varios lavados, se detectó la unión de anticuerpos mediante incubación con F(ab')₂ conjugado con FITC-IgG específica de F(ab')₂ antihumano de cabra 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA/USA) y CD56 antihumano-PE (BD Biosciences, Allschwil/Suiza). Se añadieron fragmentos F(ab')₂ 3G8 anti-Fc γ RIIIA (Ansell, Bayport, MN/USA) a una concentración de 10 μ g/ml para competir con la unión de las glucovariantes de anticuerpo (3 μ g/ml). La intensidad de fluorescencia referente a las variantes de anticuerpo unidas se determinó para las células positivas para CD56 en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Suiza). Se transfectaron células CHO mediante electroporación (280 V, 950 μ F, 0,4 cm) con un vector de expresión codificante de las cadenas α y γ de Fc γ RIIIA-Va1158. Se seleccionaron los transfectantes mediante la adición de 6 μ g/ml de puomicina y los clones estables se analizaron mediante FACS utilizando 10 μ l de anticuerpo monoclonal 3G8 anti-Fc γ RIII conjugado con FITC (BD Biosciences, Allschwil/Suiza) para 10⁶ células. La unión de IgG1 a células CHO expresantes de Fc γ RIIIA-Val158 se llevó a cabo análogamente a la unión de células NK tal como se ha indicado anteriormente.

Ensayo de la ADCC

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) como células efectoras y se prepararon utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178, USA) y siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En breve, se obtuvo sangre venosa de voluntarios utilizando jeringas heparinizadas. Se diluyó la sangre 1:0,75-1,3 con PBS (que no contenía Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺), se añadió en una capa sobre Histopaque-1077. Se centrifugó el gradiente a 400xg durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) sin interrupciones. Se recogió la interfase que contenía las CMSP y se lavó con PBS (50 ml para las células de dos gradientes) y se recolectó mediante centrifugación a 300xg durante 10 minutos a TA. Tras la suspensión del pellet con PBS, se contaron las CMSP y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200xg durante 10 minutos a RT. A continuación, se resuspendieron las células en el medio apropiado para los procedimientos posteriores.

La proporción de efector a diana utilizada para los ensayos de ADCC era de 25:1 y de 10:1 para las células CMSP y NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la densidad apropiada con el fin de añadir 50 μ l por pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Las células diana eran células de linfoma B humanas (por ejemplo células Raji) cultivadas en DMEM que contenía FCS al 10%. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a una densidad de 0,3 millones por ml con el fin de añadir 30.000 células en 10 μ l por micropocillo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50 μ l a las células diana presembradas y se dejó que se uniesen a las dianas durante 10 minutos a TA. A continuación, se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de

CO₂. Se evaluó la eliminación de las células diana mediante medición de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de células dañadas utilizando el kit de detección de citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Tras la incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800xg. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano transparente. Se añadieron 100 µl de tampón sustrato de color del kit a cada pocillo. Se determinaron los valores de V_{max} en un lector de ELISA a 490 nm durante por lo menos 10 minutos utilizando software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Se determinó la liberación espontánea de LDH a partir de los pocillos que contenían únicamente diana y células efectoras pero no anticuerpos. Se determinó la liberación máxima de pocillos que contenían únicamente células diana y Triton X-100 al 1%. Se calculó el porcentaje de eliminación mediada por anticuerpos específicos, de la manera siguiente: $((x-SR)/(MR-SR))*100$, en donde x es la media de V_{max} a una concentración de anticuerpo específica, SR es la media de la V_{max} de la liberación espontánea y MR es la media de la V_{max} de la liberación máxima.

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento

Se contaron las células diana, se lavaron con PBS, se resuspendieron en AIM-V (Invitrogen) a una densidad de 1 millón de células por ml. Se sembraron 50 µl de células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se prepararon diluciones de los anticuerpos en AIM-V y se añadieron en alícuotas de 50 µl a las células. Se dejó que los anticuerpos se uniesen a las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descongeló inmediatamente complemento sérico humano (Quidel), se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en alícuotas de 50 µl a los pocillos. Se preparó complemento de conejo (Cedarlane Laboratories) tal como describe el fabricante, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en alícuotas de 50 µl a los pocillos. Como control, se calentaron fuentes de complemento durante 30 minutos a 56°C antes de la adición al ensayo.

Se incubaron placas de ensayo durante 2 horas a 37°C. Se determinó la eliminación de las células mediante la medición de la liberación de LDH. Brevemente, las placas se centrifugaron a 300xg durante 3 minutos. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante por pocillo a una nueva placa de 96 pocillos y se añadieron 50 µl del reactivo de ensayo del kit de citotoxicidad (Roche). Una medición cinética con el lector ELISA determinó la V_{max} correspondiente a la concentración de LDH en el sobrenadante. Se determinó la liberación máxima mediante incubación de las células en presencia de Triton X-100 al 1%.

Ensayo de reducción marcada de células B de sangre completa

Se llevó a cabo la reducción marcada de las células B normales de sangre completa con los anticuerpos anti-CD20 tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, anteriormente.

Ensayo de apoptosis

Se sometió a ensayo la potencia apoptótica de los anticuerpos mediante la incubación del anticuerpo a una concentración de 10 µg/ml (condiciones saturantes respecto a la unión de antígeno) con las células diana (a una concentración de células diana de 5x10⁵ células/ml) durante la noche (16 a 24 horas). Las muestras se tiñeron con AnnV-FITC y se analizaron mediante FACS. El ensayo se realizó por triplicado.

La detección se llevó a cabo mediante citometría de flujo mediante el seguimiento de la apariencia de marcadores apoptóticos tales como la anexina V y fosfatidilserina. El control negativo (sin inducción de apoptosis) no contenía anticuerpos, sino únicamente solución salina tamponada con fosfato. El control positivo (apoptosis máxima) contenía 5 micromolar del inductor fuerte de apoptosis camptotecina (CPT).

Resultados y comentario

La comparación entre la unión al antígeno CD20 humano de las variantes de anticuerpo B-HH1, B-HH2, B-HH3, acomplejadas con la cadena ligera de B-Ly1 quimérico (mVL, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, anteriormente) o con la cadena ligera de B-Ly1 humanizado (KV1), y el anticuerpo chB-ly1 quimérico parental (descrito en el Ejemplo 1, anteriormente) muestra que todos los anticuerpos presentan un valor de EC₅₀ similar, pero que el constructo B-HH1 se une con una intensidad/estequiometría más baja que las variantes B-HH2 y B-HH3 (figura 11). B-HH1 puede distinguirse de B-HH2 y de B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición de Kabat), así como el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración de Kabat). Esto indica que la posición 28, la CDR1 completa y/o la CDR2 completa resultan importantes para la interacción anticuerpo/antígeno.

La comparación entre B-HL1, B-HH1 y el anticuerpo parental chB-ly1 quimérico mostró la ausencia de actividad de unión en el constructo B-HL1, y aproximadamente la mitad de intensidad/estequiometría de unión en comparación con B-ly1 (figura 12). Tanto B-HL1 como B-HH1 están diseñados basándose en los marcos aceptores derivados de la clase VH1 humana. Entre otras diferencias, la posición 71 (numeración Kabat: la posición 71 de Kabat corresponde a la posición 72 de la secuencia SEC ID nº 48) del constructo B-HL1 es una diferencia notable, indicando su importancia putativa para la unión de antígenos.

Al comparar los datos de unión de antígeno de las figuras 9 a 13, las variantes BHH2-KV1, BHLB-KV1 y BHL11-KV1 muestran la mejor afinidad de unión, entre las diferentes variantes de anticuerpo humanizado sometidas a ensayo, para la CD20 humana sobre la superficie de las células humanas. Las diferencias entre B-HH2, por una parte, y B-HL8 y B-HL11, por la otra, se localizan en las regiones FR1 y FR2 únicamente, siendo idénticas las tres CDR (comparar, por ejemplo, las SEC ID nº 32, 56 y 60, que no están numeradas según Kabat pero la numeración de Kabat de las cuales puede ser fácilmente determinada por el experto ordinario en la materia). B-HL8 y B-HL11 derivan sus secuencias FR1 y FR2 de la clase VH3 humana, mientras que el marco completo de B-HH2 se deriva de VH1 humano. B-HL11 es un derivado de B-HL8 con la única mutación Glu1Gln (la posición 1 es la misma tanto en la numeración Kabat como en el sistema convencional de numeración utilizado en el listado de secuencias), mientras que Gln es el residuo aminoácido en el constructo B-HH2. Esto significa que el intercambio Glu1Gln no altera ni la afinidad ni la intensidad de unión. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son 14 residuos del marco, de entre los que uno o más presentará una influencia sobre el comportamiento de unión a antígeno de este anticuerpo.

El constructo B-HL4 se deriva del anticuerpo B-HH2 mediante la sustitución del FR1 del B-HH2 por el FR1 de la secuencia VH1_45 de la línea germinal humana. Este constructo muestra una capacidad de unión a antígeno que se ha reducido mucho, a pesar de presentar diferentes aminoácidos en sólo tres posiciones dentro del FR1. Estos residuos se encuentran localizados en las posiciones 2, 14 y 30 (numeración Kabat). De éstas, la posición 30 podría ser una posición influyente, debido a que es parte de la definición de Chothia de la CDR1. El análisis global de todas las curvas de unión de las figuras 9 a 13 indica que los residuos siguientes de la cadena pesada de B-ly1 humanizado (numeración Kabat) resultan importantes para la unión a CD20: N35 (extremo de CDR1 de Kabat), CDR1 de Kabat completo, CDR2 de Kabat completo y CDR3 de Kabat completo, residuos A71 y R94 (en este caso, R94 no puede sustituirse por una treonina) e Y27. A28 y S30 también contribuyen en menor grado. Además, la CDR3 de Kabat y todos los residuos canónicos resultan importantes para la unión a antígeno. No se introdujeron retromutaciones en la cadena ligera humanizada, que presentaba las CDR1, CDR2 y CDR3 de Kabat injertadas. Para la inducción de apoptosis (figuras 14, 15 y 21), la variante más potente era la variante de B-ly1 humana BHH2-KV1 (todavía más potente que chB-ly1 original y mucho más potente que un anticuerpo con una secuencia idéntica al Rituximab, C2B8). Otras variantes humanizadas (derivados de BHL8) que pueden recuperar la apoptosis incrementada son: B-HL12 a B-HL17 (ver la Tabla) y BHHI (marcos mixtos) y BHH9 ("marcos mixtos" con una retromutación, S30T). Las posiciones 9 y 48 (numeración Kabat) pueden entrar en contacto con el antígeno. Las variantes BHH4 a BHH7 son otras variantes humanizadas de B-ly1 que no introducen secuencias no humanas adicionales.

Son propiedades importantes del anticuerpo B-ly1 humanizado son que es un anticuerpo anti-CD20 de tipo II según se define en Cragg M.S. y Glennie M.J., *Blood* 103(7):2738-2743 (abril de 2001). Por lo tanto, no indujo, tras la unión a CD20, ninguna resistencia significativa a la extracción con detergentes no iónicos de CD20 de la superficie de células humanas CD20⁺, utilizando el ensayo descrito para este fin en Polyak M.J. y Deans J.P., *Blood* 99(9):3256-3262, 2002. Definitivamente indujo significativamente menos resistencia a la extracción con detergente no iónico de CD20 que del anticuerpo C2B8 (otro anticuerpo anti-CD20 con secuencia idéntica al Rituximab (ver la publicación de patente US nº 2003/0003097, de Reff). Tal como se esperaba de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II, el B-ly1 humanizado no presentaba ninguna actividad significativa de lisis mediada por el complemento y claramente una actividad de lisis mediada por el complemento más alta que la del anticuerpo anti-CD20 C2B8 (IgG1 quimérica con secuencia idéntica al Rituximab). Otra propiedad importante del anticuerpo B-ly1 humanizado era que resultaba muy potente en el ensayo de agregación homotípica. En este ensayo, se incubaron células humanas CD20-positivas, células Daudi, en medio de cultivo celular durante hasta 24 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en un incubador de células de mamífero, tal como se describe en detalle en (referencia de Deans), con el anticuerpo a una concentración de 1 microgramo por ml y en paralelo a una concentración de 5 microgramos por ml. A título de comparación, se realizó una incubación paralela, de control, de las células bajo condiciones idénticas, aunque utilizando el anticuerpo anti-CD20 C2B8. En diferentes puntos del tiempo, incluyendo las 8 horas y las 24 horas de incubación, las células se inspeccionaron visualmente utilizando un microscopio. Se encontró que el anticuerpo B-ly1 humanizado conducía a una fuerte agregación homotípica, con agregados significativamente más grandes que los inducidos por la adición del anticuerpo de control C2B8. Además, y consistentemente con que el anticuerpo fuese anti-CD20 de tipo II, indujo niveles más altos de apoptosis al incubar células humanas CD20-positivas con el anticuerpo B-ly1 humanizado en comparación con un control bajo condiciones idénticas utilizando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con secuencia idéntica al Rituximab.

Se produjeron variantes glucomanipuladas de los anticuerpos humanizados mediante coexpresión de la glucosiltransferasa GnTIII, conjuntamente con los genes de anticuerpo, en células de mamífero. Esto condujo a un incremento de la fracción de oligosacáridos no fucosilados unidos a la región Fc de los anticuerpos, incluyendo oligosacáridos no fucosilados biantenarios, tal como se ha descrito en la patente WO nº 2004/065540 (figuras 17 a 19). Los anticuerpos glucomanipulados presentaban niveles significativamente más altos de unión a receptores FcγRIII humano (figura 20) y también de actividad de ADCC (figura 16) en comparación con el anticuerpo no glucomanipulado y con el anticuerpo C2B8. El anticuerpo B-ly1 humanizado también era más potente en la inducción de la reducción marcada de las células B humanas en un ensayo de sangre completa (figura 16) que el anticuerpo de control C2B8. Esto era verdad tanto para el anticuerpo B-ly1 no glucomanipulado como para la versión glucomanipulada del mismo. El anticuerpo glucomanipulado era aproximadamente 1.000 veces más potente que el anticuerpo anti-CD20 de control C2B8 en la reducción marcada de las células B en el ensayo de sangre

completa. Esta comparación resulta importante tanto para las formas humanizadas no glucomanipuladas como para las glucomanipuladas del anticuerpo B-ly1, debido a que mostró que, en ensayos que combinaban actividades dependientes del receptor Fc, tales como la ADCC, más la lisis mediada por el complemento, más la inducción de apoptosis, ambas formas de B-ly1 eran significativamente más potentes que C2B8, aunque ambas formas de B-ly1 reducían drásticamente la actividad de lisis mediada por el complemento. La ADCC, las actividades de eliminación celular dependientes del receptor Fc y la inducción de apoptosis se encontraban presentes en esta actividad superior de las variantes humanizadas del anticuerpo B-ly1. Además, en el ensayo de apoptosis, las formas tanto glucomanipuladas como no glucomanipuladas de este anticuerpo anti-CD20 de tipo II eran potentes, y las variantes de Fc manipuladas de afinidad de unión incrementada a los receptores Fc γ resultaban todavía más potentes en la inducción de la apoptosis que la variante sin manipulación de Fc, y siendo todas las variantes significativamente más potentes que el anticuerpo de control C2B8. El mecanismo exacto para la agregación homotípica incrementada y la inducción de apoptosis mediada por anticuerpos anti-CD20 de tipo II no se conoce y la unión concomitante a otras moléculas sobre la superficie de las células CD20-positivas, tales como los receptores Fc γ , podría influir sobre esta importante propiedad. Por lo tanto, resultaba importante demostrar que los anticuerpos anti-CD20 de tipo II que habían sido manipulados en su región Fc para la afinidad de unión incrementada a los receptores Fc gamma, incluyendo Fc γ RIII y con un incremento asociado de la actividad de ADCC, todavía eran capaces de inducir una apoptosis fuerte, incluso más alta que la variante sin manipulación de Fc, y agregación homotípica. La inducción de apoptosis es importante debido a que in vivo existen localizaciones en el cuerpo en las que pueden encontrarse células CD20-positivas diana, pero en las que el acceso a las células Fc γ RIII-positivas resulta más difícil que en la sangre. Dichas localizaciones son, por ejemplo, los ganglios linfáticos. En dichas localizaciones, la inducción de apoptosis por el anticuerpo anti-CD20 mismo puede resultar crucial para una buena eficacia de la terapia con anticuerpo anti-CD20 en el ser humano, tanto para el tratamiento de neoplasias hematológicas, tales como los linfomas no de Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica de las células B como para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide y el lupus mediante el enfoque de eliminación de células B. La afinidad de unión incrementada a Fc γ RIII y la ADCC más elevada del anticuerpo anti-CD20 de tipo II de Fc manipulada también puede ser un atributo muy importante para dichas terapias. Finalmente, la actividad e lisis mediada por el complemento reducida o negligible de este tipo de anticuerpos anti-CD20 de tipo II, incluyendo las variantes humanizadas y de Fc manipulada, también puede resultar importante; una activación más alta del complemento por los anticuerpos anti-CD20 se ha correlacionado con un incremento de los efectos secundarios no deseables.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GlycArt Biotechnology AG
 Umana, Pablo
 Bruenker, Peter
 Suter, Tobias
 Puentener, Ursula
 Moessner, Ekkehard
 Ferrara, Claudia

<120> Moléculas ligantes de antígeno con afinidad de unión a receptor de Fc y función efectora incrementadas

<130> 1975.029PC01

<160> 78

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

ES 2 672 640 T3

<400> 1

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

<210> 2

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 2

ggacctgaac	tgggtgaagcc	tggggcctca	gtgaagattt	cctgcaaage	ttctggctac	60
gcattcagtt	actcttggat	gaactgggtg	aaactgaggc	ctggacaggg	tcttgagtgg	120
attggaacga	tttttctctg	agatggggat	actgactaca	atgggaaatt	caagggcaag	180
gccacactga	ctgctgacaa	atctccaac	acagcctaca	tgcaactcac	cagcctgacc	240
tctgtggact	ctgcggctca	tttatgtgca	agaaatgtct	ttgatgggta	ctggttagtt	300
10 tactggggcc	aagggactct	ggtcactgtc	tctgca			336

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus sp.

ES 2 672 640 T3

<400> 3

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45

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

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
65 70 75 80

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

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 4

<211> 309

5 <212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 4

aatccagtc aatccttgg aac atcagcttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta 60

catagtaatg gcatacctta tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120

ctcctgattt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt 180

gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tctgggtggt 240

tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacttccg gaggggggac caagctggaa 300

10 ataaaacgg 309

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Mus sp.

15 <400> 5

tactcttga tgaac 15

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

20 <213> Mus sp.

<400> 6

ggctacgcat tcagttac 18

<210> 7

<211> 30

25 <212> ADN

<213> Mus sp.

ES 2 672 640 T3

- <400> 7
ggctacgcat tcagttactc ttggatgaac 30
- 5 <210> B
<211> 48
<212> ADN
<213> Mus sp.
- <400> 8
aggctagta agagtctcct acatagtaat ggcacactt attgtat 48
- 10 <210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus sp.
- <400> 9
cagatgtcca acctgtctc a 21
- 15 <210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus sp.
- 20 <400> 10
gctcaaaatc tagaactcc gtacacg 27
- <210> 11
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> ADNc quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 11

```

atgggttggg gcctcatctt gctcttctct gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtccgag      60
gtcaagctgc agcagttctg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc      120
tgcaaaagctt ctggctacgc attcagttac tcttgatga actgggtgaa actgaggcct      180
ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tttcctggag atggggatac tgactacaat      240
gggaaattca agggcaaggc cacactgact gctgacaaaat cctccaacac agoctacatg      300
caactcacca gcctgaacct tgtggactct gcggtctatt tatgtgcaag aaatgtcttt      360
gatggttact ggttagttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagctagc      420
accaagggcc catcgggtctt ccccctggca cctcctoca agagcacctc tgggggcaca      480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttcccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc      600
tactcctcca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaatct      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      780
gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgagggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggtgaaatgg caaggagtac     1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacct ctccaaagcc     1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catgcctgtg     1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccaagcctcc cgtgctggac     1260
tcogacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag     1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag     1380
agcctctccc tgtctcggg taaatga                                           1407

```

<210> 12

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc quimérico de ratón-humano

5

ES 2 672 640 T3

<400> 12

```

atggattttc aggtgcagat taccagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
agaggagaca ttgtgctcac ccaaaactaca aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc      120
atctctcgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg      180
tatctgcaga agccaggcca gtctctcagc ctcttgattt atcagatgtc caaccttgtc      240
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc      300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cgggtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cggcatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctctgtg tgtgtgctgt      480
ctgaataact tctatcccag agaggcoaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctcccaa      540
tcgggtaact ccaggagag  tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcacc  tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      660
gtcaccacc  agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720
  
```

<210> 13

<211> 468

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 13

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
 1           5           10           15

Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
           20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
           35           40           45

Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50           55           60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn
65           70           75           80

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
           85           90           95
  
```

10

ES 2 672 640 T3

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

ES 2 672 640 T3

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 14

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 14

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Thr Asn Pro
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

ES 2 672 640 T3

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

5 <210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15
Tyr Ser Trp Met Asn
1 5

10 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16
Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

15 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

ES 2 672 640 T3

<400> 17
 Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn
 1 5 10

5 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 18
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 19
 Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

15 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 20
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 21
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

25 <400> 21
 cggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c 51

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Mus sp.

<400> 22
 tttcctggag atggggatac tgac 24

<210> 23
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 23
 cggatttttc ctggagatgg ggatactgac 30

<210> 24
 40 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

ES 2 672 640 T3

<400> 24
aatgtctttg atggttactg gttagtttac 30

<210> 25
<211> 17
5 <212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 25
Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
10 <211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26
Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

15 <210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 27
Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
20 1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

25 <400> 28
Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 357
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 29
cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg ctcccgata caccttcagc tattcttggg tgagctgggt gcggcaggoc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaocg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt acggcogaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacogt ctactca 357

ES 2 672 640 T3

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 30
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

10 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 31
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctccggata cgccttcagc tattcttggg tgaactgggt gggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcgaca aatocactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatggtt actggettgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

20 <210> 32
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 672 640 T3

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 32

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
          20          25          30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
5          50          55          60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 33

<211> 366

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 33

```

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcgtgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg ctcccgata cgccttcagc tattcttggc tgaactgggt gggcaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac      180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat      240
atgggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc      300
tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagct      360
agcacc                                           366
    
```

15 <210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 34

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

- 5 <210> 35
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 35

cagggtgcaat tgggtgcagtc tgggcgtgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggtc 60
 tcttgcgaagg tctccggata egcgttcagc tattcttggg tgaactgggt gccgcaggcc 120
 ootggacaag ggctcagatg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcgcaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcca 357

- 15 <210> 36
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 36

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

20

ES 2 672 640 T3

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

5 <210> 37
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN quimérico de ratón-humano

10 <400> 37
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tctctgcaagg cttccggata ogcgttcagc tattcttggga tgagctgggt gcggcaggcg 120
 cctggacaag ggcctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gogatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcgcgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

15 <210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 672 640 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 39
- <211> 357
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

<220>
 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 39
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctccggata cgccttcagc tattcttgga tcaattgggt gcggcaggcg 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggaagg atctttcccg gogatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt acgcgcgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 10 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacogt ctctcca 357

- <210> 40
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 40

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 41

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gtttaagaagc ctggggagttc agtgaaggtc 60

tctctgcaagg cttdcggata cgccttcagc tttctcttggg tctcgtgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcagagtg gatgggaagg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt acgcgcgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgt attactgtgc aagaaatgtc 300

10 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 42

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

<210> 43

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 43

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gtttaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc	60
tctctgcaagg ctcccgata caccttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcaggcc	120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac	180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc	300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacogt ctctca	357

10

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 44

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

<210> 45

<211> 357

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 45

caggtagcaat tggtagcagtc tggcgctgaa gttagaaga ctggcgctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttggg tgaactgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggaagg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacogt ctctca 357

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 46

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 47

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgtgaa gttaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccctcacc tattccttga tgcactgggt gggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaagg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caocgtctat 240

10 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcogtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 48

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 48

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

<210> 49

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 49

gaggtgcaat	tggtgcagtc	tgccgctgaa	gttaagaagc	ctggggccac	cgtgaagatc	60
tccctgcaagg	tgctccgata	caccttcacc	tattottgga	tgcaactgggt	gcagcaggcc	120
cctggaaaagg	ggctcgagtg	gatggggacgg	atctttcccg	gcgatgggga	tactgactac	180
10 gcagagaaat	tccaaggaag	agtcacaatc	acagccgaca	cgtccactga	caccgcctat	240
atggagctga	gcagocctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aaccaatgtc	300
tttgatgggt	actggcttgt	ttactggggc	caggaaccc	tggtcacctg	ctctca	357

<210> 50

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 50

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

<210> 51

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 51

gagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60
 10 tctctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttggg tgaactgggt gcagcaggcc 120
 cctggaaagg ggctcgagtg gatgggaagg atctttcccg gogatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaaggggaag agtcacaato acagccgaca cgtccactga cacgcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac aoggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
 tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 52

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 52

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

<210> 53

<211> 366

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 53

10 cagatgcaat tggtagcagtc tggcgcgtgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60
 tccagcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg ggcgatggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggt actggttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagct 360
 agcacc 366

<210> 54

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 357

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 55

gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcgggctc octgoggctc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggct 120
 cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt acgcccagaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 10 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcca 357

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 56

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

<210> 57

<211> 456

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 57

cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttgggtg 60
 cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttgggtca 120
 agcctggcgg gtccctgctg ctctctctgtg cagcctctgg attcgcatc agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgoggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccc 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacaogggcc 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgattactgg ggcagggaa 420
 10 cctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 58

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

- 5 <210> 59
- <211> 357
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 59

caggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtcaagc ctggcgggtc cotgcccgtc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttggg tgaactgggt gcggcaggct 120
 cctggaaagg gcctcagatg ggtgggaocg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcogaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcogtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtoaccgt ctctctca 357

- <210> 60
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 15 <220>
- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 60

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

- 5 <210> 61
- <211> 456
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 61
 cgggaattcgg cccacocggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagctcac tcogaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtcctgctgg ctctctctcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgoggcag gctcctggaa agggcctoga gtgggtggga cggatcttct 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
 acaaatccac tagcacagdc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccttggtcac cgtctctctca gctagcgaat tctoga 456

- 15 <210> 62
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 62

```

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50                               55                               60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                               70                               75                               80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
                100                               105                               110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115
  
```

- 5 <210> 63
- <211> 456
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 63

```

cggaaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg      60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtcga gtctggagga ggcgtggtca      120
agcctggcgg gtccctgogg ctctcctgog cagcctctgg attcacattt agctattctt      180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc      240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attacgccc      300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg      360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggcagggaa      420
ccctggtcac cgtctctca gctagcgaat tctcga      456
  
```

- <210> 64
- <211> 119
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 65
- <211> 456
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 65

```

cggaattcgg cccaccgggtg gacaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg      60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtoga gtccggagga ggcttgaaga      120
agcctggcgg gtcctcgagg ctctctcgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt      180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc      240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccc      300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccc      360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactbg gccagggaa      420
ccttggtcac cgtctctca gctagcgaat tctcga      456
    
```

- 15 <210> 66
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 66

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

- 5 <210> 67
- <211> 456
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

- 10 <223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 67

cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggctc ttccctgctg ctctctctgog cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctctctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 cggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgcog 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggcog 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccttggtcac cgtctctctca gctagcgaat tctcga 456

- 15 <210> 68
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>

- <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 68

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

<210> 69

<211> 456

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 69

cggaattcgg cccaccggg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacaattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctoga gtgggtggga cggatctttc 240
 cggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccc 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggago tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattaactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgbttactgg ggccagggaa 420
 ccctgggtcac cgtctctcca gctagogaat tctoga 456

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 70

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

<210> 71

<211> 456

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 71

	cggaattcgg cccacoggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg	60
	cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga gctttggtca	120
	agcctggcgg gtccctggcg ctctctctgg cagcctcttg attcacatht agctattctt	180
	ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc	240
10	ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg	300
	acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg	360
	tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa	420
	ccctggtcac cgtctctca gctagcgaat tctcga	456

<210> 72

<211> 119

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 72

```

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
      50                               55                   60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65                               70                   75                   80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
      100                               105                   110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
  
```

<210> 73

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 73

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 74

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1                               5                               10                   15

Ala His Ser
  
```

15 <210> 75

<211> 345

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> ADN quimérico de ratón-humano

ES 2 672 640 T3

<400> 75
gatatcgtga tgaccacagac tcaactctcc ctgcccgta cccctggaga gcccgccagc 60
attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg goatcaacta tttgtattgg 120
tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctctctgatt atcaaatgtc caaccttgtc 180
tctggcgctc ctgaccgggt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtg aggctgagga tgttggagtt tattactgag ctccagaatct agaacttctc 300
tacaccttcg gccgagggac caaggtggag atcaaacgta cgggtg 345

<210> 76
<211> 115
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<400> 76
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60
10 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val
115

<210> 77
<211> 66
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 77
atggacatga gggccccgc tcagctctg ggcctctgc tgcctctgggt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

ES 2 672 640 T3

<210> 78
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 78
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
 20

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado que comprende:
 - 5 (a) una región variable de cadena pesada seleccionada de entre SEC ID nº 62, SEC ID nº 64, SEC ID nº 66, SEC ID nº 68, SEC ID nº 70 y SEC ID nº 72, y
 - (b) la región variable de cadena ligera de KV1 de SEC ID nº 76.
- 10 2. Anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID nº 61, 63, 65, 67, 69 o 71 y una región variable de cadena ligera que está codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que es por lo menos 80% idéntica a SEC ID nº 75, en el que dicho anticuerpo induce niveles más altos de apoptosis al incubarlo con células humanas positivas para CD20 que un control bajo condiciones idénticas utilizando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con una secuencia idéntica a Rituximab.
- 15 3. Vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada según la reivindicación 1 o 2 y polinucleótido codificante de una región variable de cadena ligera según la reivindicación 1 o 2.
- 20 4. Vector según la reivindicación 3, que es policistrónico.
5. Célula huésped aislada que comprende el vector de expresión según la reivindicación 3 o 4 o un polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada según la reivindicación 1 o 2 y un polinucleótido codificante de una región variable de cadena ligera según la reivindicación 1 o 2.
- 25 6. Célula huésped según la reivindicación 5, en la que dicha célula huésped ha sido manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.
- 30 7. Célula huésped según la reivindicación 6, en la que dicho polipéptido que presenta actividad de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión que comprende además un dominio de localización en Golgi de un polipéptido residente en el Golgi heterólogo.
- 35 8. Célula huésped según la reivindicación 7, en la que dicho dominio de localización en el Golgi se selecciona de entre el dominio de localización de la manosidasa II, el dominio de localización de la $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II, manosidasa I o $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa nuclear.
- 40 9. Método para la producción de un anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado según la reivindicación 1 o 2 que comprende cultivar la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 bajo condiciones que permiten la producción de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicho cultivo.
- 45 10. Anticuerpo anti-CD20 de tipo II humanizado, en el que el anticuerpo es obtenible a partir de la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
- 50 11. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 10, u obtenible mediante el método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc manipulada mediante glucosilación.
12. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo presenta un incremento de la fracción de oligosacáridos no fucosilados unidos a dicha región Fc manipulada mediante glucosilación.
13. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo presenta un incremento de la fracción de oligosacáridos no fucosilados bisectados unidos a dicha región Fc manipulada mediante glucosilación.
- 55 14. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo presenta niveles significativamente más altos de unión a receptores Fc γ RIII humanos que el anticuerpo no manipulado mediante glucosilación.
- 60 15. Anticuerpo según la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo presenta niveles significativamente más altos de actividad ADCC que el anticuerpo no manipulado mediante glucosilación.
16. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 10 a 15, u obtenida mediante el método según la reivindicación 9, y un portador farmacéuticamente aceptable.

17. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 10 a 15, u obtenido mediante el método según la reivindicación 9, para la utilización como medicamento destinado al tratamiento de un trastorno de las células B.
- 5 18. Anticuerpo según la reivindicación 17, en el que dicho trastorno de las células B es un linfoma de células B.
19. Utilización del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1,2 o 10 a 15, u obtenible mediante el método según la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno tratable mediante la reducción marcada de las células B.
- 10 20. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 10 a 15, o producido mediante el método según la reivindicación 9, para la utilización como medicamento destinado al tratamiento de un trastorno tratable mediante la reducción marcada de las células B.
- 15 21. Utilización según la reivindicación 19 o anticuerpo según la reivindicación 20, en la que dicho trastorno es una neoplasia hematológica o una enfermedad autoinmunitológica.
22. Anticuerpo o utilización según la reivindicación 21, en el que dicha neoplasia hematológica es linfoma de células B, linfoma no de Hodgkin o leucemia linfocítica crónica de las células B.
- 20

Conector Inicio de la SEC ID nº 1 (aminoácidos) y de la SEC ID nº 2 (nucleótidos)

```

1  GAGGTCRAGC TGCAGCAGTC T GGACTGAA CTGGTGAAGC CTGGGGCCIC AGTGAAGATT TCCTGCAAG TCCTGTGGCTA CGCATTICAGT TACTCTTGGA
  CTCCAGTTCG ACGTCCGTCAG A CCTGGACTT GACCACTTCG GACCCCGGAG TCACTTCTTA AGGACCGTTC GAAGACCCGAT GCSTAGTCA ATGAGAACCT
  E V K L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y A E S Y S W
  >>.....B-Ly1 vh.....>>

101 TGAAC TGGGT GAAC TGGAGG CCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATGGACGG ATTTTCCTTG GAGATGGGA TACTGAC TAC AATGGGAAT TCAGGGCAA
  ACTTGACCCA CTTTGACTCC GGACCTGTCC CAGAACTCAC CTAACCTGCC TAAAAGGAC CTCTACCCCT ATGACTGATG TTACCCCTTA AGTTCCCGTT
  M N W V K L R P G Q G L E W I G R I F P G D G D T D Y M G K F K G
  >.....B-Ly1 vh.....>

201 GGCCACACTG ACTGCTGACA AATCCCTCAA CACAGCTTAC CCAAGCTGAC CTCTGTGGAC TCTGGGTCT ATTTATGTGC AAGAAATGTC
  CCGGIGTGAC TGACGACTGT TTAGGAGGTT GTGTGGAAG TACGTTGAGT GGTGGACTG GAGACACCTG AGACGCCAGA TAAATACAG TTCTTTACAG
  K A T L T A D K S S N T A Y M Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V
  >.....B-Ly1 vh.....>

301 TTGTATGGTT ACTGGTTAGT TTACTGGGC CAAGGACTC TGGTCACTGT CTTGCA
  ARACTACCAA TGACCAATCA AATGACCCCG GTTCCCTGAG ACCAGTGACA GAGACGT
  F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A
  >.....B-Ly1 vh.....>>

```

FIG. 1

Conector Inicio de la SEC ID nº 1 (aminoácidos) y de la SEC ID nº 2 (nucleótidos)

```

-----
HphI
-----
1  CACATTTGGC TCACCCAAAC TACA AATCCA GTCACTCTTG GAACATCAGC TTCATCTCC TGCAGGTCTA GIAGAGICT CCTACATAGT AATGGCATCA
CTGTAAACCG AGTGGGTTTG ATGT TTAGGT CAGTGAAGAC CTTGTAGTCG AAGGTAGAGG ACGTCCAGAT CAITCTCAGA GGATGTATCA TTACCCGTAGT
D I V L T Q T T N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I
>>.....B-Ly1 v.1.....>

-----
PseRI
-----
101 CTTATTTGTA TTGATATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAGCTCCTG ATTTATCAGA TGTCRAACCT TGTCACAGA GTCCCAGACA GGTTCAGTAG
GAATAAACAT AACCATAGAC GTCTTCGGTC CGGTACAGAG ATCGAGGAC TAAATAGTCT ACAAATATG ACAGGTCTCT CAGGTCTGT CCAAGTCAAC
T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V F D R F S
>>.....B-Ly1 v.1.....>

-----
BtsI
-----
201 CAGTGGGICA GBACTGATT TCACACTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGTGG TGTTTATTAC TGTGTCAAA ATCTAGAACT TCCGTACACG
GTCACCCAST CTTGACTAA AGTGGACTC TTAGTGTCT CAGCTCGAC TCCTACACC ACAATAATG ACACGATTT TAGATCTTGA AGGCAITGTC
S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y C A Q N L E L P Y T
>>.....B-Ly1 v.1.....>

-----
MseI
-----
301 TTCGGAGGG GGACCANGCT GGAATAAAA CGG
AAGCTCCCC CCTGGTTCGA CCTTTATTTT GCC
F G G G T K L E I K R
>>.....B-Ly1 v.1.....>

```

FIG. 2

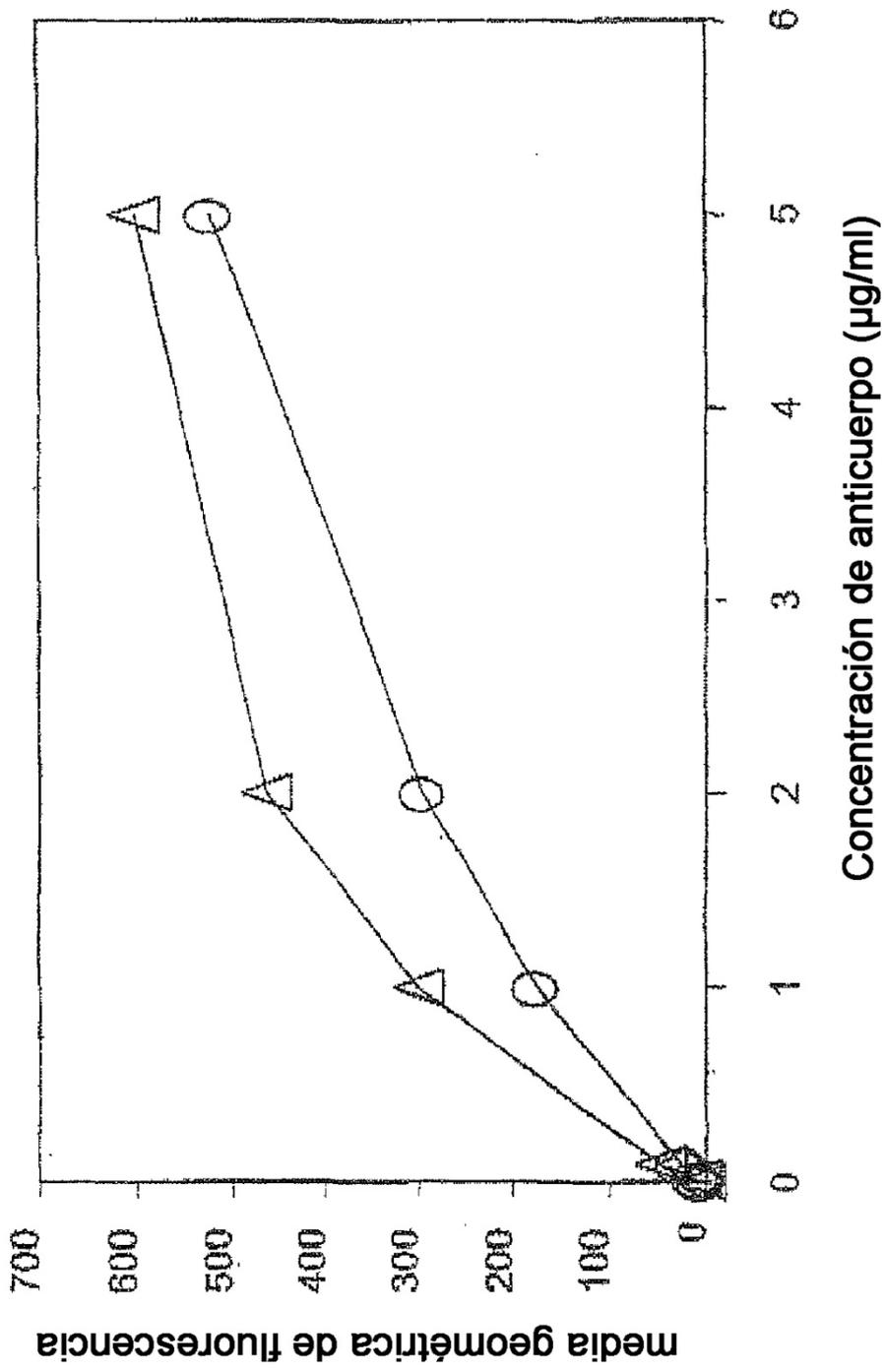


FIG.3

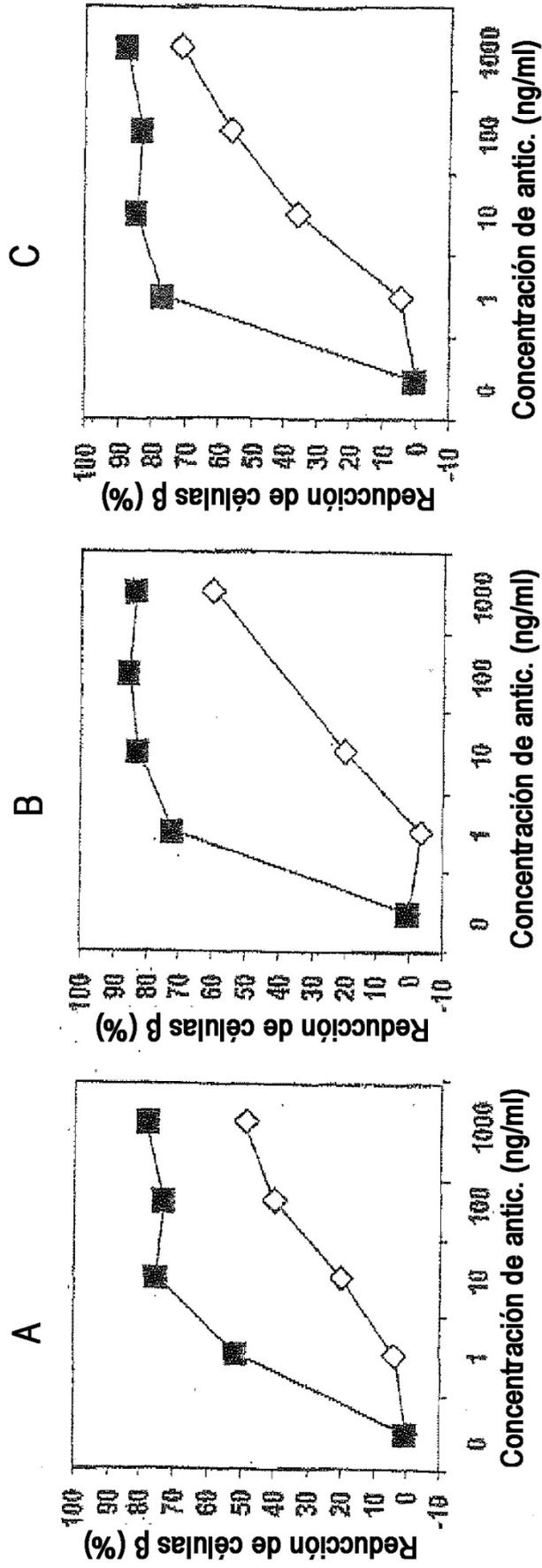


FIG. 4

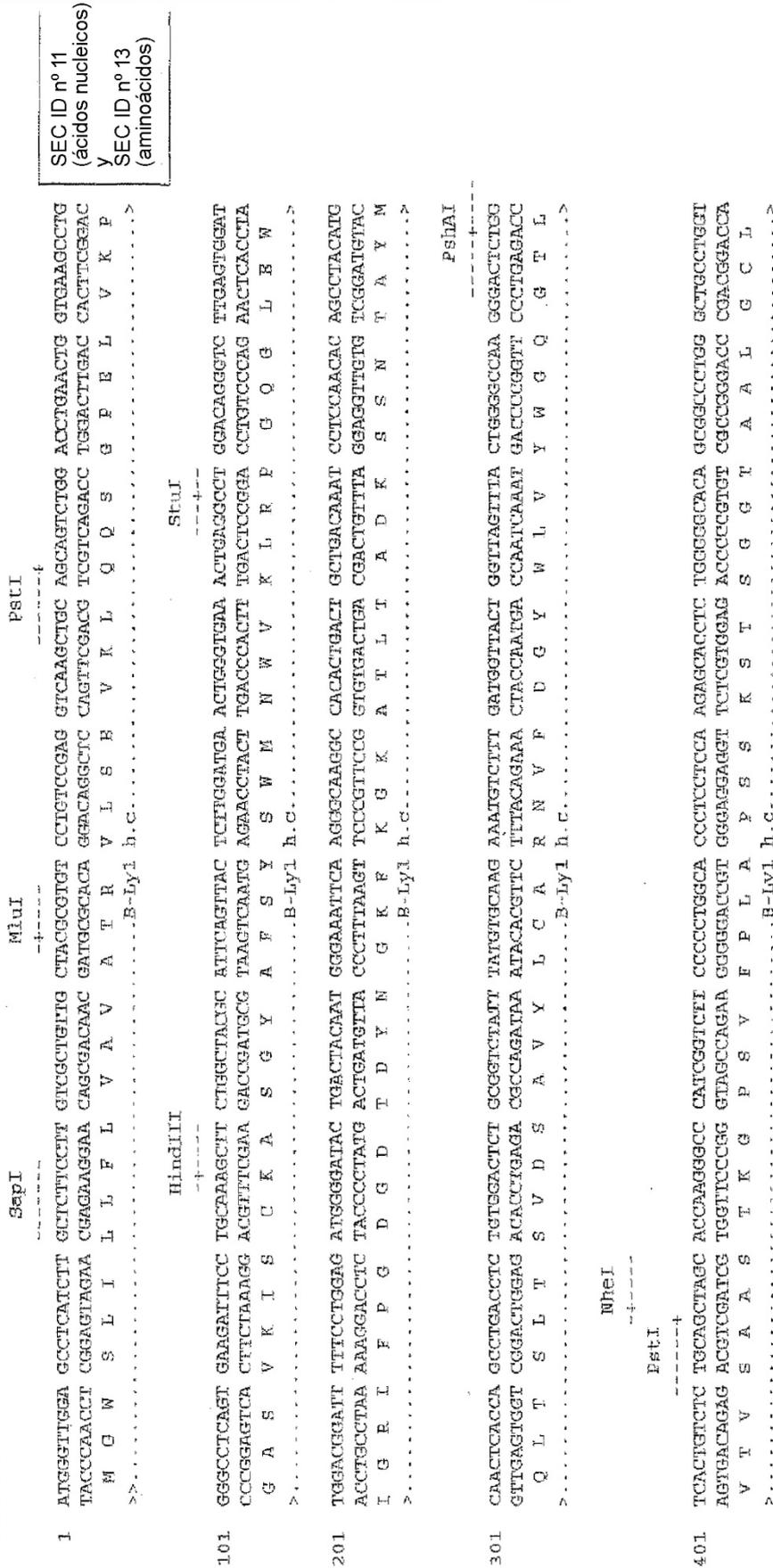


FIG. 5A

SEC ID nº 11
(ácidos nucleicos)
y
SEC ID nº 13
(aminoácidos)

```

501 CAAGGACTAC TTCGCCGAAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC TGACCAGCGG CGTGACACCC TTCGCCGCTG TCCTTCACTC CTCAGGACTC
GTTCCTGATG AAGGGCTTG GCCACTGCGA CAGCACCCTG AGTCCCGGG ACTGCTGACC GCACGCTGG AAGGGCCGAC AGGATGFCAG GATCTCTGAG
V K D Y F P E P V T V S M N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
>.....B-Ly1 h.c.
601 TACTTCCTCA GCACGCTGGT GACGCTGCC TCACGACGCT TGGGACCCCA GACCTTCATC TGCACGCTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
ATGAGSSEAT CGTCGCACCA CTTGCAAGG AGGTCGTGGA ACCCHTGGT CTGGAGTAG ACGTTGACT TAGTGTTCGG GTGCTTGGG TTCACACCTGT
Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
>.....B-Ly1 h.c.
701 AGAAGGACGA GCCCAAATCT TGTACAAA CTCACATG CCCACCTGC CCAGCACCTG AACTCTCTGG GGCACCTCA GTCCTCTCT TCCCCCAA
TCTTCTGCT CCGGTTTAGA ACACCTTTT GATCTGTATC GGTGCGACG GGTCTGGAC TTGAGGACCC CCTTGGAGT CAGAAGGAGA AAGGGGTTT
K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
>.....B-Ly1 h.c.
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGT ACATGCTTGG TGTGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
TGGTTCCTG TGGAGTACT AGAGGCTG GGGACTCCAG TGTACGACCC ACCACTGCA CTCGGTCTT CTGGACTCC ACTTCAAGTT GACCATGGAC
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
>.....B-Ly1 h.c.
901 GACGGCTGG AGTGCATAA TGCACAAGA AAGCCCGGG AGGACAGTA CAACACACG TACCCTGTGG TCAGCTCTT CACCTCTCT CACCAGACT
CTGCCGACC TCCACGTATT ACGTCTCTT TCCGGCGCCC TCCCTGTCAT GTGTCTGTC ATGGCACACC AGTCCGAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTTGA
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
>.....B-Ly1 h.c.
1001 GGCTGATGG CAACAGTAC AAGTGCAGG TCTCAACAA AGCCCTCCA GCCCCATCC AGAAACCAI CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCGGAGAAC
CGGACTTACC GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGTGTGT TCGGAGGGI CCGGGTACG TCTTTTGTG GAGGTTCTGG ITTCCCGTGG GGGTCTTGG
W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G O P R B
>.....B-Ly1 h.c.

```

AhdI
-----+

FIG. 5B

<p>1101</p>	<p>ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACACAGG TCAGCTTGAC CTGCTTGGTC AAAGGCTTCT ATCCACGGA CATGCCCGTG TGTCCACAMG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT ACTCGACTGG TTCTTGGTCC AGTGGACCTG GACGGACCCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCCT GTAGCGGCAC P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y F S D I A V >.....>> B-Lyl h.c.....></p>	<p>SEC ID nº 11 (ácidos nucleicos)</p>
<p>1201</p>	<p>GAGTGGAGA GCAATGGCA GCGGGAGAC AACTACAGA CCAGCCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCCGTGG CTCACCTCT CGTTACCGT CCGCCCTTG TTGATGTTCT GGTGGGAGG GCAGACCIG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATGTCGTTG GAGTGGCACC E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F P L Y S K L F V >.....>> B-Lyl h.c.....></p>	<p>SEC ID nº 13 (aminoácidos)</p>
<p>1301</p>	<p>ACAGACAG GTGGCAGCG GGAACCTCT TCGATGCTC CGTGATGAT GAGGCTTGG ACACACTA CACGCAGAG AGCCCTCCC TGTCTCCGG TGTCTGTC CACCGTCTC CCGTTGCAGA AGATACGAG GCACACGTA CTCGAGACG TGTGTGTGAT GTCCGCTTC TCGGAGAGG ACAGAGGCC D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P >.....>> B-Lyl h.c.....></p>	
<p>1401</p>	<p>TAAATGA ATTACT G K >.....>> B-Lyl h.c.</p>	

FIG. 5C

SEC ID nº 12
(ácidos nucleicos)
Y
SEC ID nº 14
(aminoácidos)

```

1  ATGGAAATTTT AGGTGCAGAT TATCAGCTTC CTGCTHATPCA GTCTCTCAGT CATATATGTC AGAGAGACA TTGTCTCAC CCAACTACA AAUCCAGTCA
   TACCTAAAG TCCAGTCTA ATAGTCGAG GACGATTAAGT CACGAGATCA GTATACACAGG TCTCTCTCTT AACACGAGTG GGTITGATGT TTAGTTCAGT
   M D F Q V Q I I S F L L I S A S V I M S R G D I V L I Q T T N P V
   >>.....B-Ly1 I.C.....>

          PstI
          -----+
101  CTCCTTGGAA ATCAGCTTCC ATCTCTGCA GGTCTAGTAA GATCTCTCTA CATAGTAATG GCACTACTWA TTTGTATGTTG TATCTGCAGA AGCCAGGCCA
   GAGAACCTTG TAGTCGAAGG TAGAGAGAGT CCRGATCAAT CTGAGAGAGAT GTATCATTTAC CGTATGTAAT AACATAAAC ATAGACGTCT TCGGTCCGGT
   T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W Y L Q K P G
   >.....B-Ly1 I.C.....>

          PstI
          -----+
201  GTCTCTCAG CTCCTGATTT ATCAGATGTC CAACCTTCTC TCAGGAGTCC CAGACAGGTT CAGTAGCAGT GGGTCAGGAA CTGATTTTCC ACTGAGATTC
   CAGAGGATC GAGGACTAAA TAGTCTACAG GTTGGACAG AGTCTCTCAGG GTCTCTCTCA GTCTCTCTCA CCCAGTCTT GACTAAGTG TGACTCTTAG
   Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I
   >.....B-Ly1 I.C.....>

          XbaI
          -----+
301  AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGGGGGTTT TAVTACTGTG CTCAAAATCT AGRACCTCCG TACACGTTCG GAGGGGGAC CAAGCTGGA AAAAACCCTA
   TCGTCTCACC TCCGACTCTT ACACCTACAA APTATGACAC GAGTITTAGA TCTTGAAGCC ANGTCAAGC CTCCTCCCTG GTTCGACCTT TATTTTGCAT
   S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T F G G G Y K L E I K R
   >.....B-Ly1 I.C.....>

          XmnI
          -----+
401  CCGTGGCTGC ACCACTTTC TCTCTCTCC CCCCATCTGA TGCAGGTTG AAATCTGGA CTGCTCTCTGT TGTGTCTCTG CTGATTAAC TCTATCCCAG
   GCCACCGAGG TGGTAGACAG AAGTAGAAG GCGGTAGACT ACTCGTCAAC TTTAGACCTT GACGAGACA ACACAGGAC GACTTATGA AGATAGGTTG
   T V A A P S V F I F P S D R Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
   >.....B-Ly1 I.C.....>

          XmnI
          -----+
501  AGAGGCCAAA GTACAGTGGG AGGIGGATA CCCCCTTCAA TCCGGTAACT CCCAGGAGG TGTCCAGAG CAGGACAGCA AGGACACAC CTACAGCTTC
   TCTCCGGTTT CAATGACCT TCCACCTATT GGGGGAGGT AGCCATTTGA GGGTCTCTC ACAATCTTC GTCTCTCTG TCCCTGCTG GATGTCGGG
   R B A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
   >.....B-Ly1 I.C.....>

```

FIG. 6A

SacI
-----+

```

601  AGCAGCACCC TGACCTGAG CAACCCAGAC TAGGAGAAC ACAAGTCTA CGCTCGAA GTCACCCATC AGGCCCTGAG CTCGCCCGTC ACNAGAGCT
    TCGTCGIGGG ACYGGGACTC GTTTCGCTG ATGCTCTTGG TTTTCAGAT GCGGAGCTT CAGTGGTAT GCCGGGACTC GAGCGGCAG TGTTCCTGA
    S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S E P V E K S
    >.....B-Ly1 l.c.....>

701  TCAACAGGGG AGAGTGTAG
    ACTTGTCCC TCTCACATC
    F M R G E C -
    >....B-Ly1 l.c.....>

```

SEC ID nº 12 (ácidos nucleicos)
SEC ID nº 14 (aminoácidos)

FIG 6B

A

CDR1(Kabat): TACTCTTGGATGAAC TyrSerTrpMetAsn	SEC ID n° 5 SEC ID n° 15
CDR1(Chothia): GGCTACGCATTCAGTTAC GlyTyrAlaPheSerTyr	SEC ID n° 6 SEC ID n° 16
CDR1(AbM): GGCTACGCATTCAGTACTCTTGGATGAAC GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn -----	SEC ID n° 7 SEC ID n° 17
CDR2(Kabat): CGGATTTTTCTGGAGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEC ID n° 21 SEC ID n° 25
CDR2(Chothia): TTTCCTGGAGATGGGGATACTGAC PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEC ID n° 22 SEC ID n° 26
CDR2(AbM): CGGATTTTTCTGGAGATGGGGATACTGAC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp -----	SEC ID n° 23 SEC ID n° 27
CDR3(Kabat, Chothia, AbM): AATGTCTTTGATGGTTACTGGTTAGTTTAC AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEC ID n° 23 SEC ID n° 27

B

CDR1(Kabat): AGGTC TAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTAT ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEC ID n° 8 SEC ID n° 18
CDR2(Kabat): CAGATGTCCAACCTTGTCTCA GlnMetSerAsnLeuValSer	SEC ID n° 9 SEC ID n° 19
CDR3(Kabat): GCTCAAAATCTAGAACTTCCGTACACG AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr	SEC ID n° 10 SEC ID n° 20

FIG. 7

1. porcentajes relativos

	Bly-1 m1 031024 016	+ EndoH Bly-1 m1 031024 017
1053		
1256		
1282		
1298		3.70%
1339	18.60%	17.90%
1460		4.30%
1486	5.90%	5.50%
1502	5.10%	3.70%
1543	35.00%	39.20%
1622		
1647	4.60%	3.00%
1664	7%	
1680		
1688	11.00%	10.30%
1705	7.20%	7.30%
1810		
1826		
1850	5.90%	5.20%
1972		
2012	100%	100%

FIG. 8A

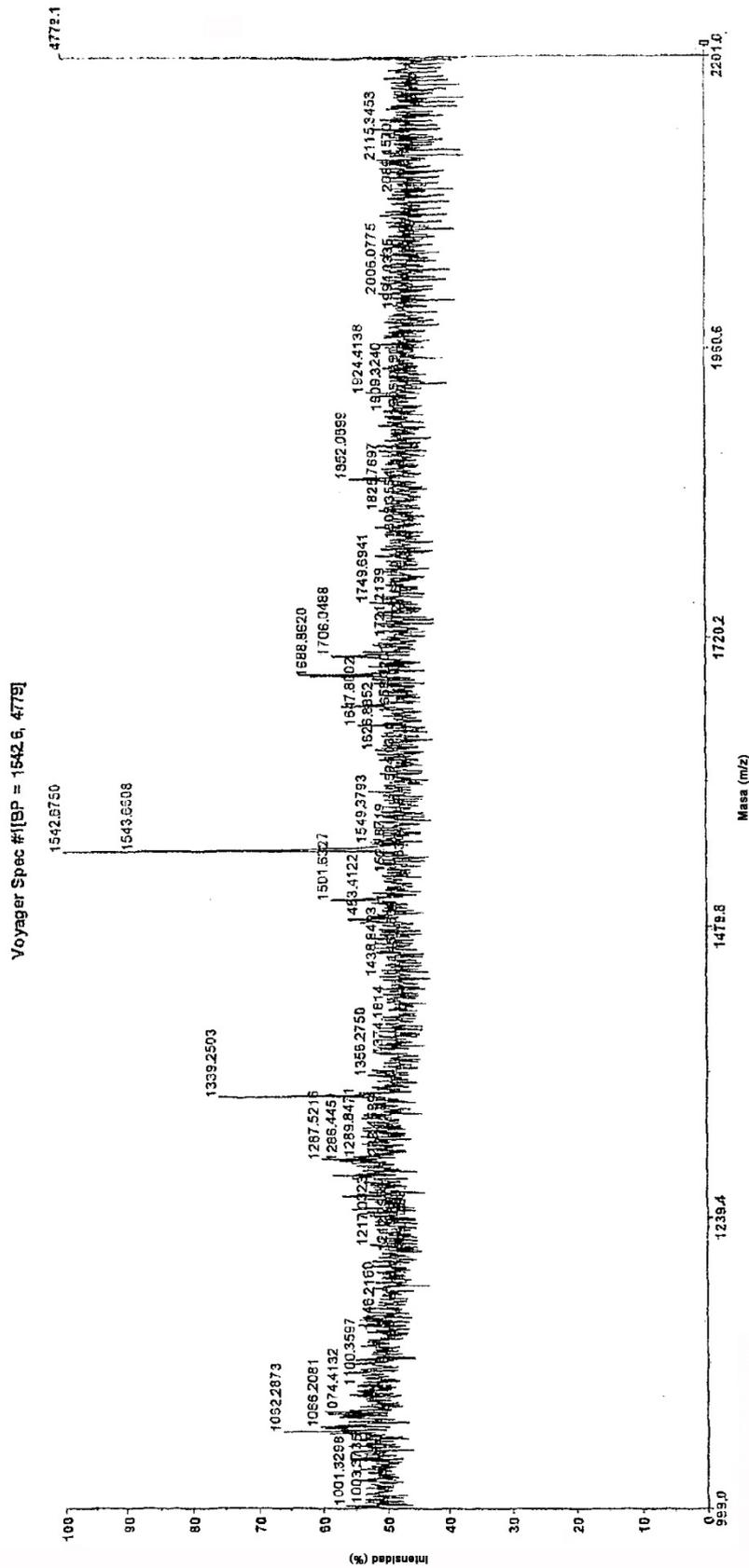


FIG. 8B

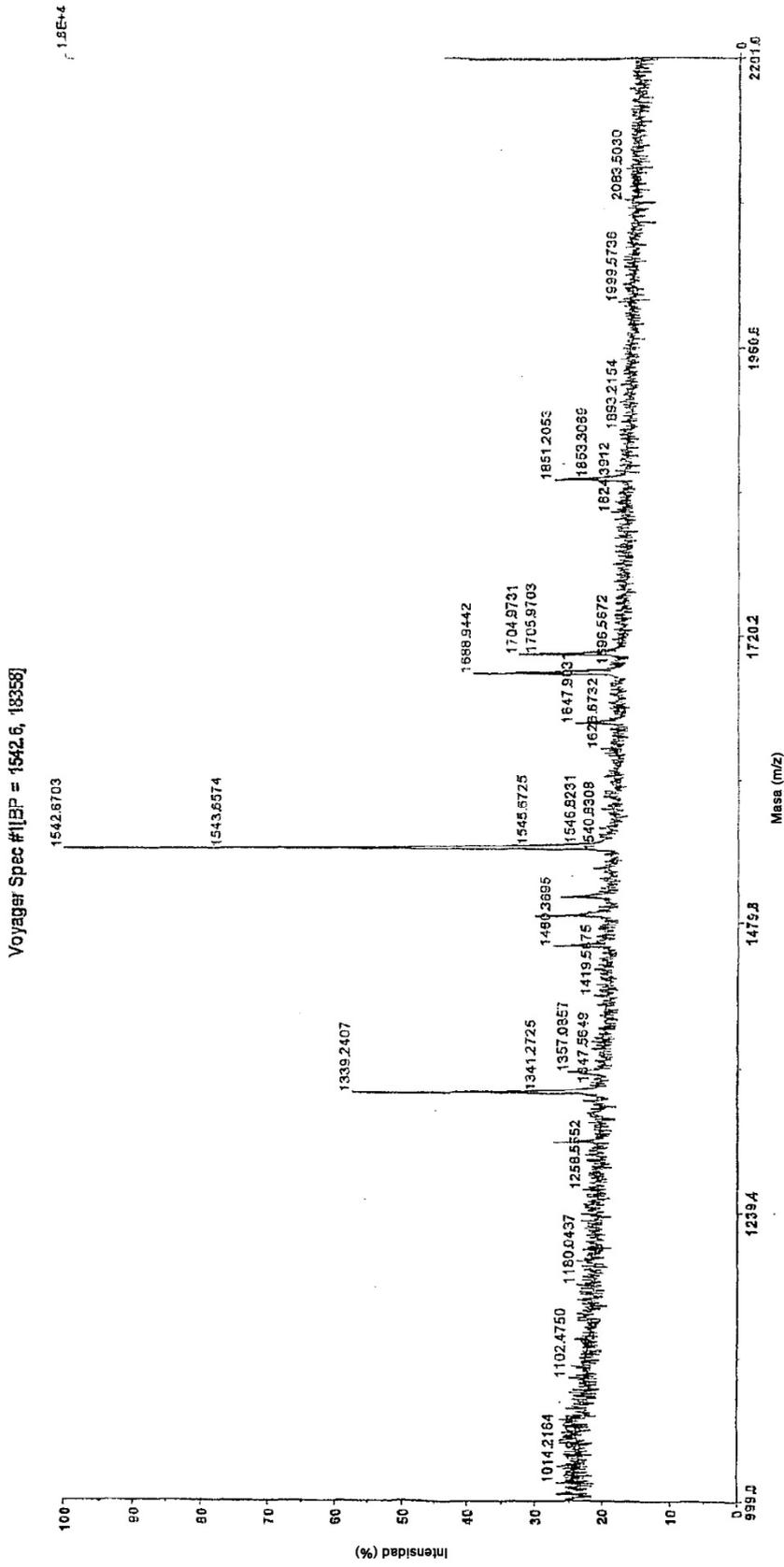


FIG. 8C

Figura 9

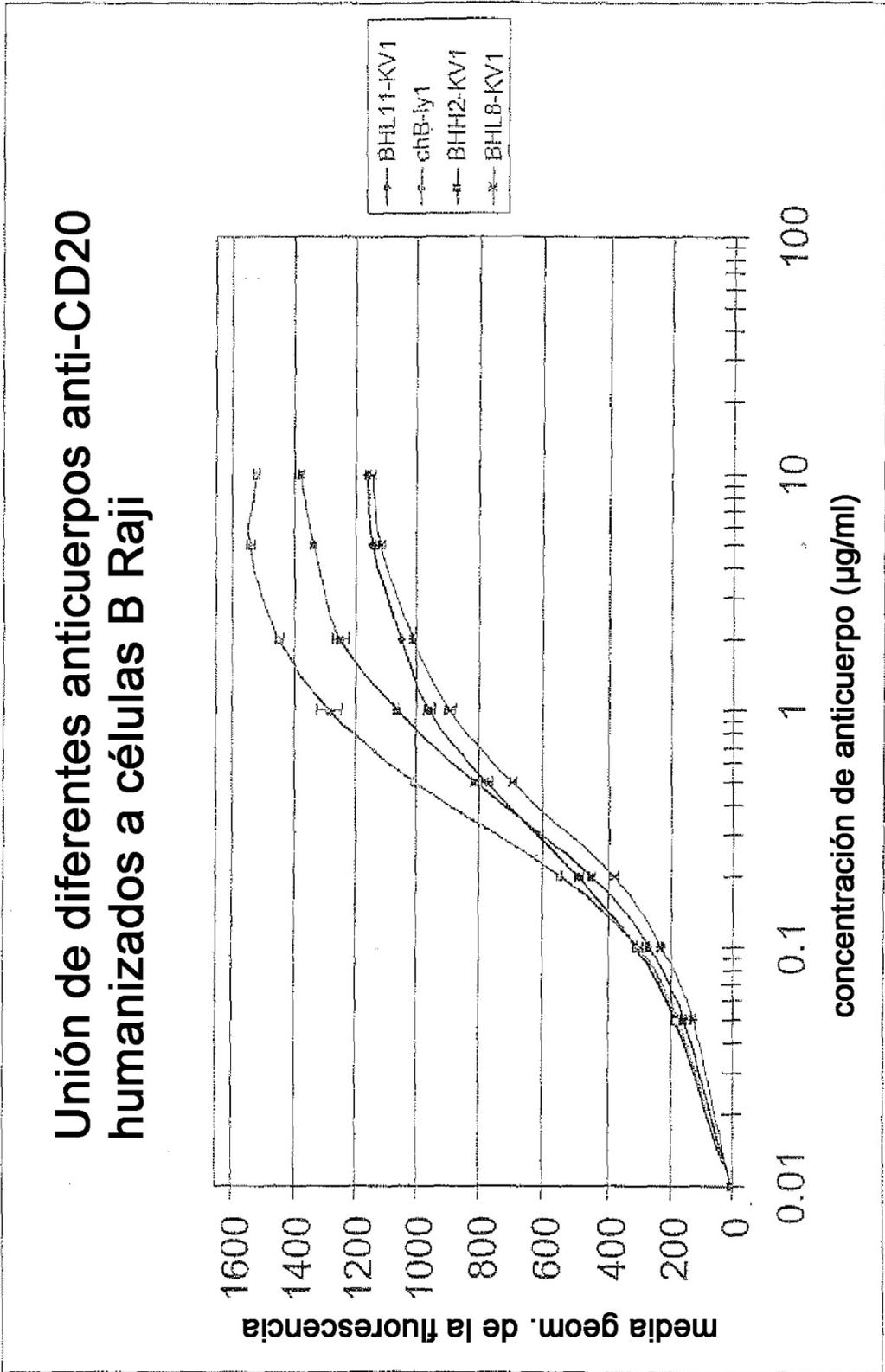


Figura 10

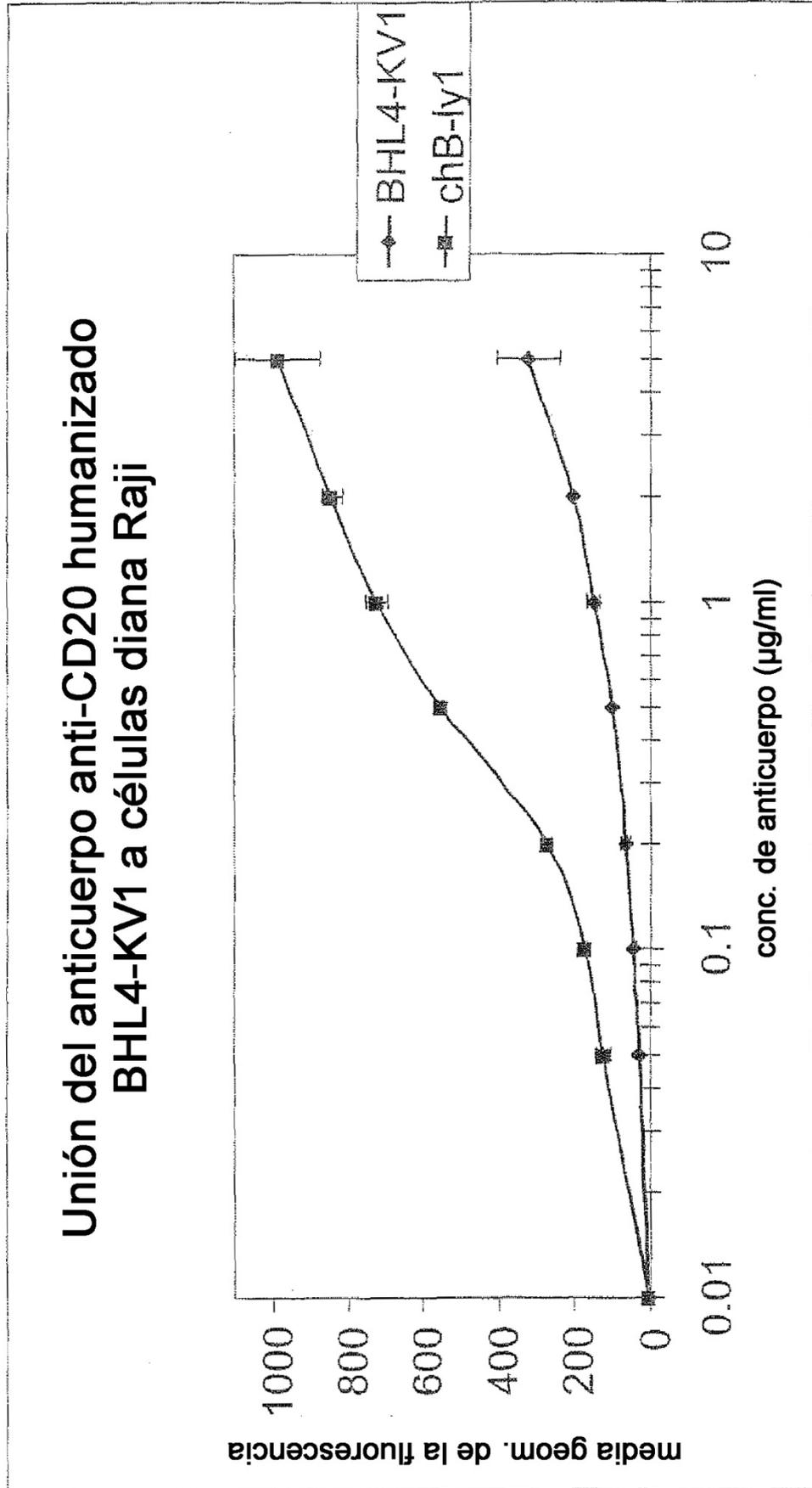


Figura 11

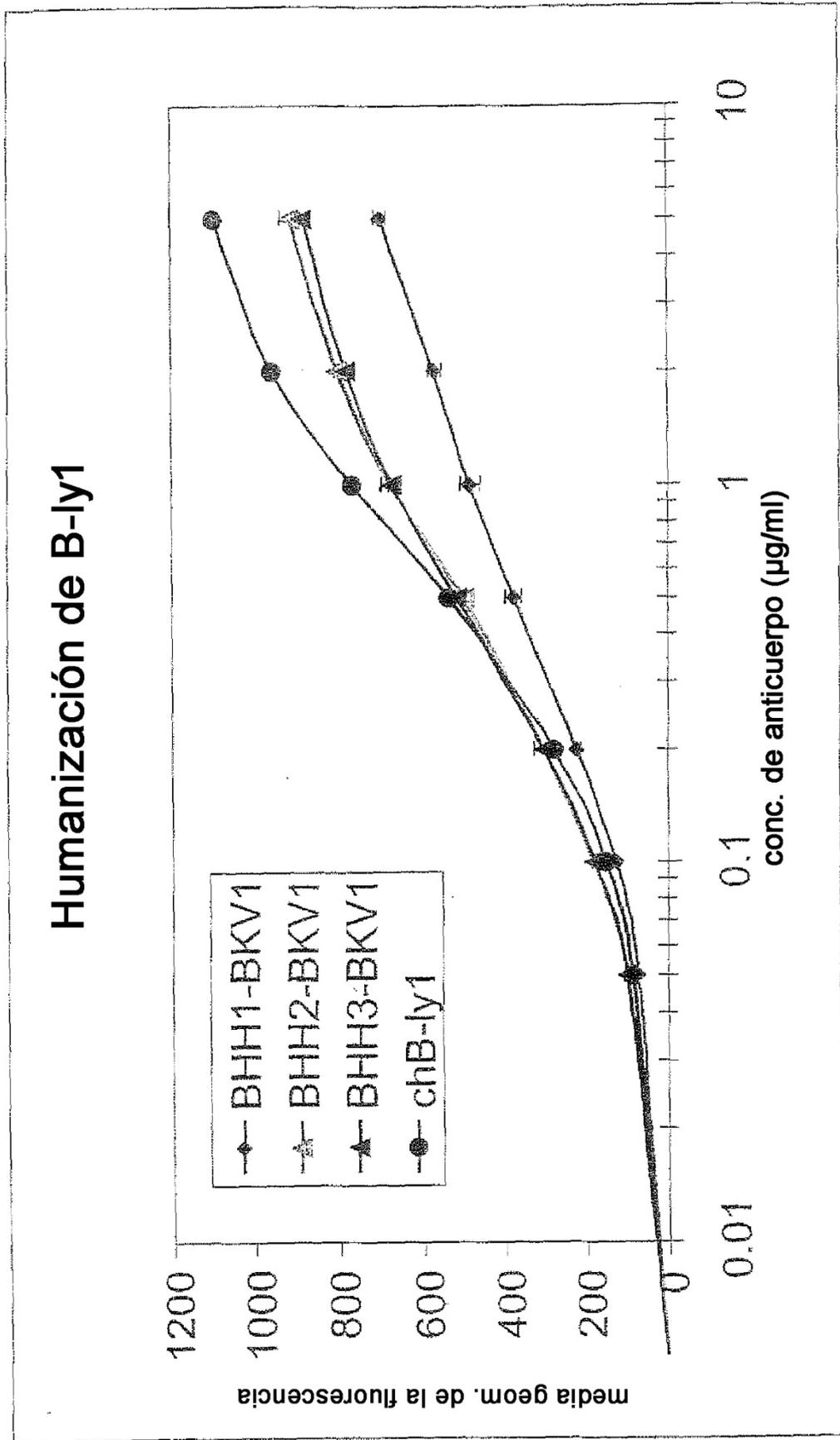


Figura 12

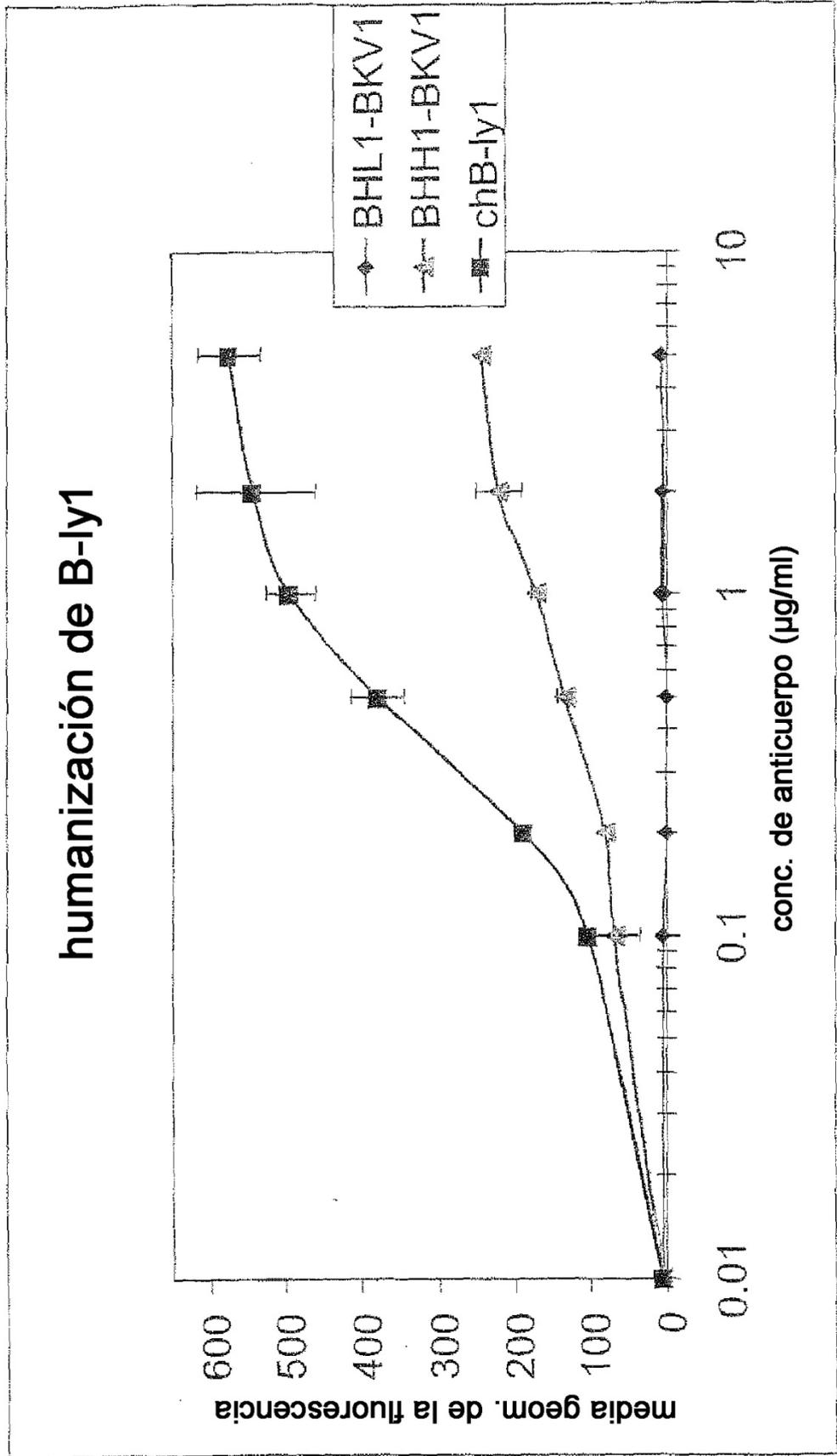


Figura 13

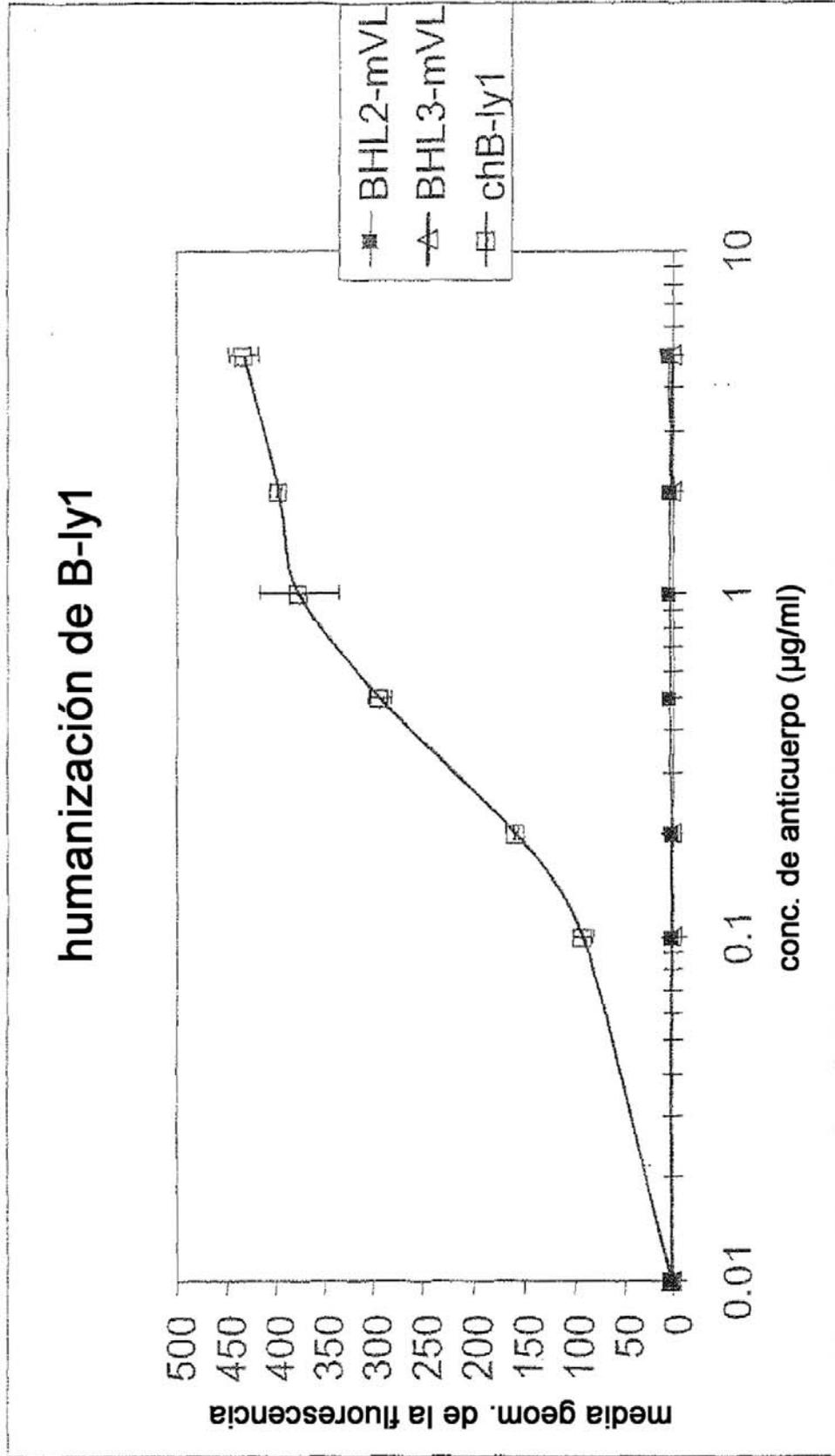


Figura 14

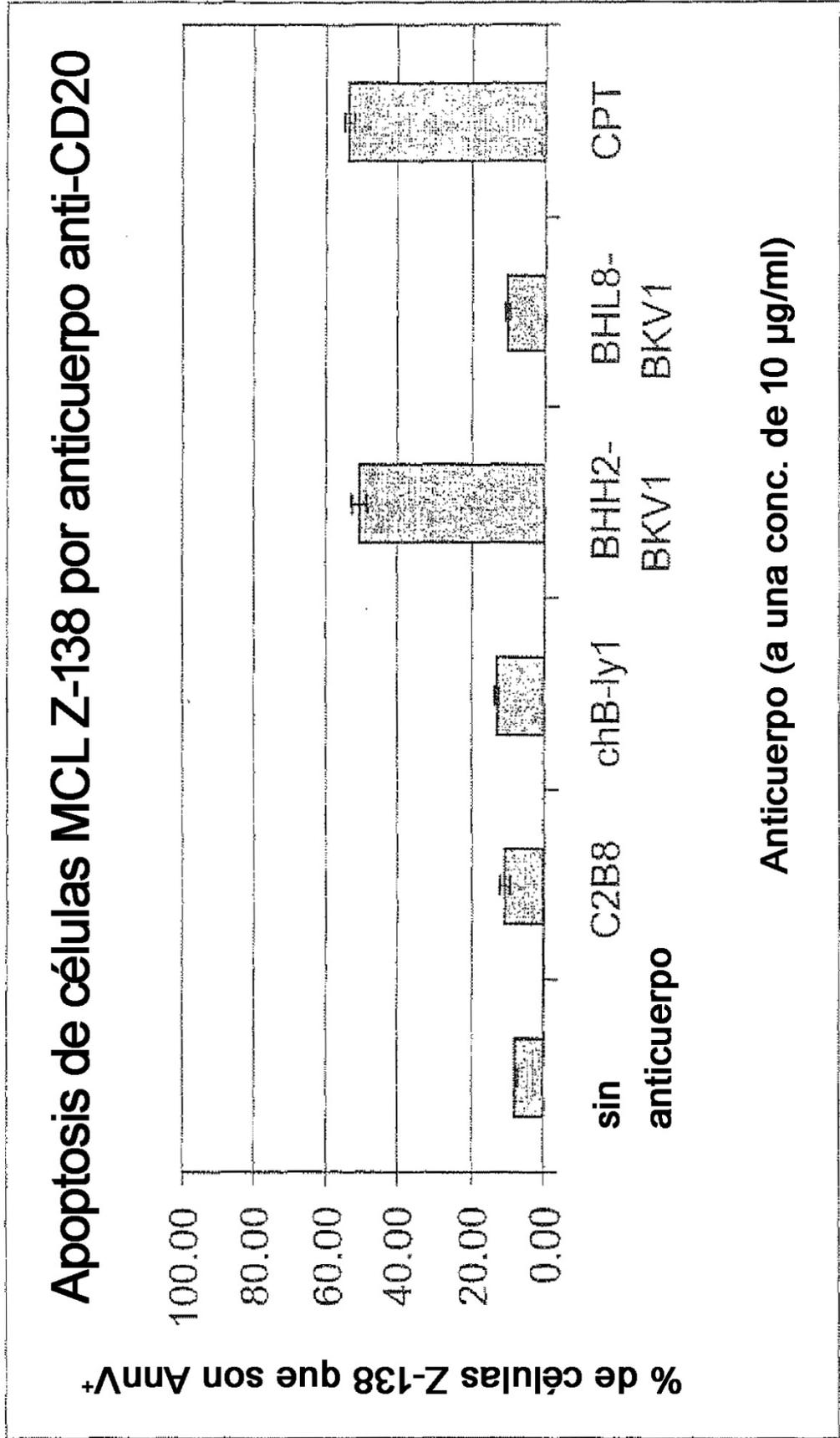
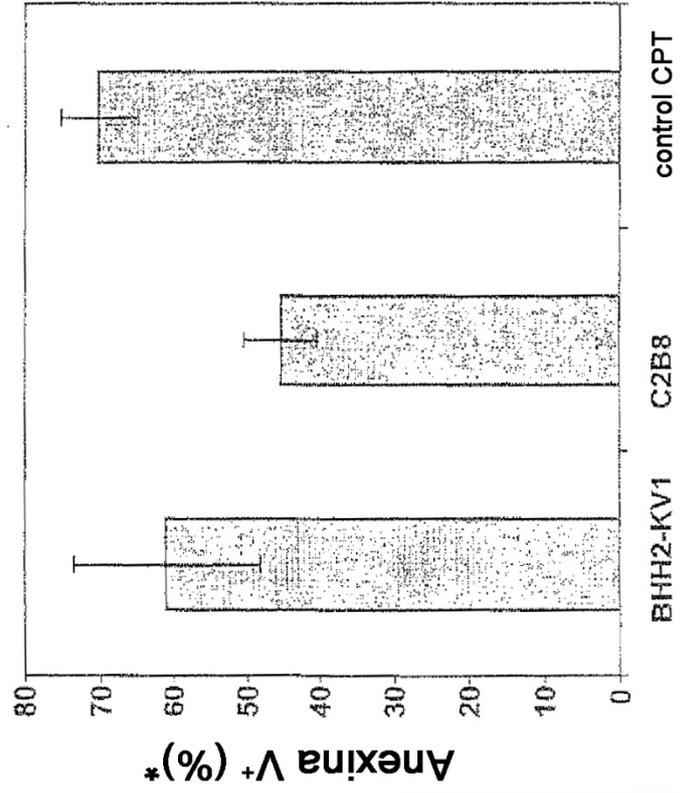


Figura 15

PR-1 (línea celular DLBCL)



Z-138 (línea celular MCL)

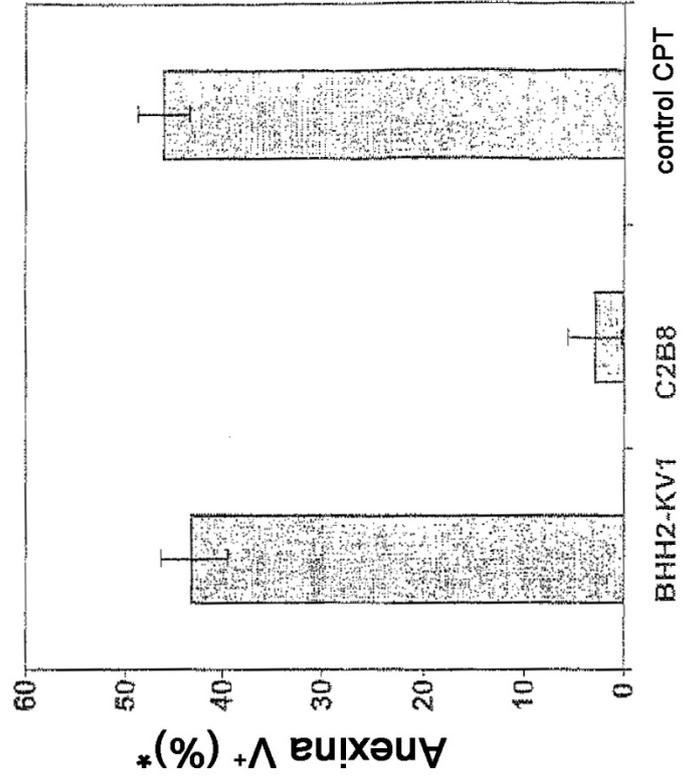
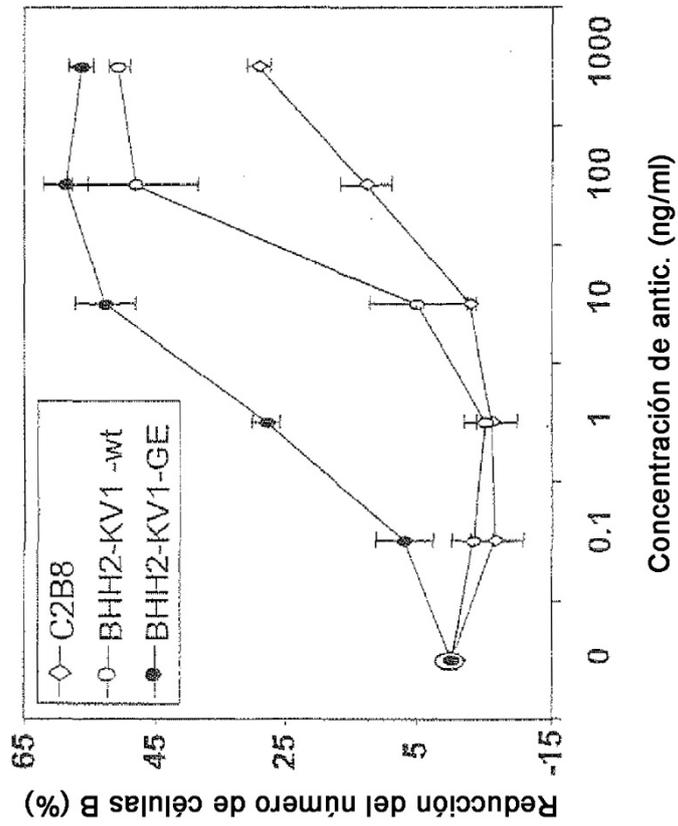


Figura 16

Reducción del número de células B normales en sangre completa



ADCC con Raji como células diana

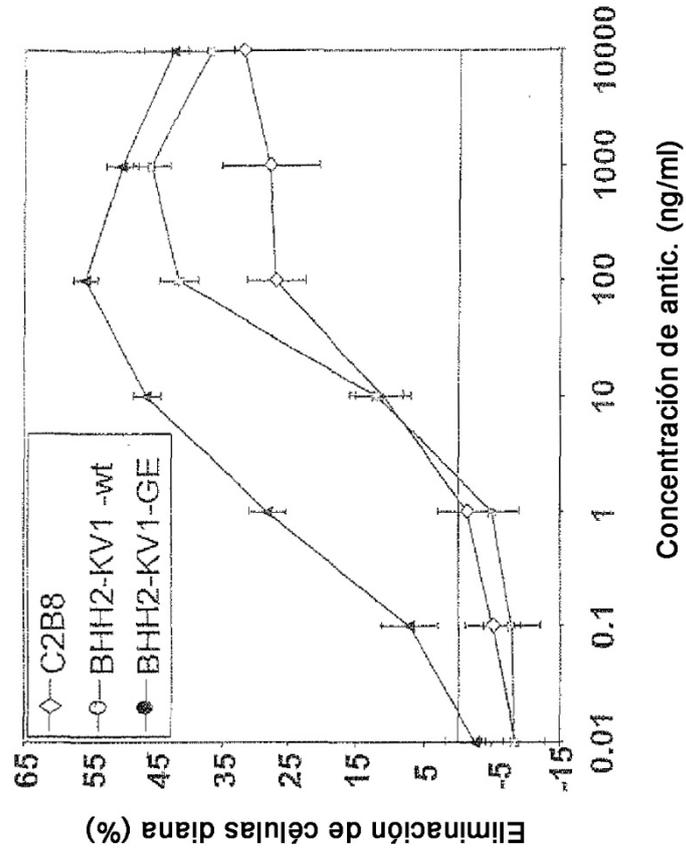


Figura 17

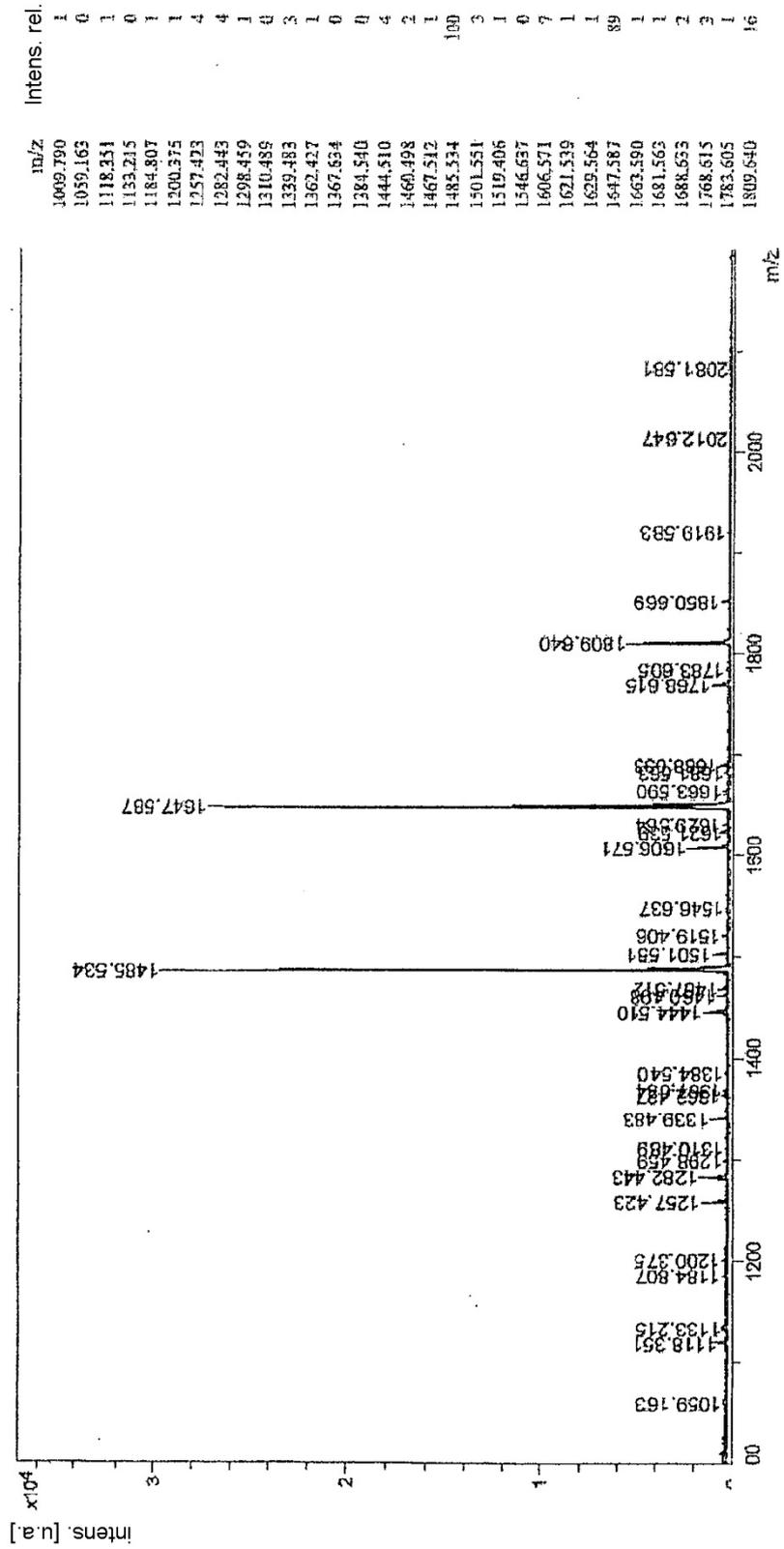


Figura 18

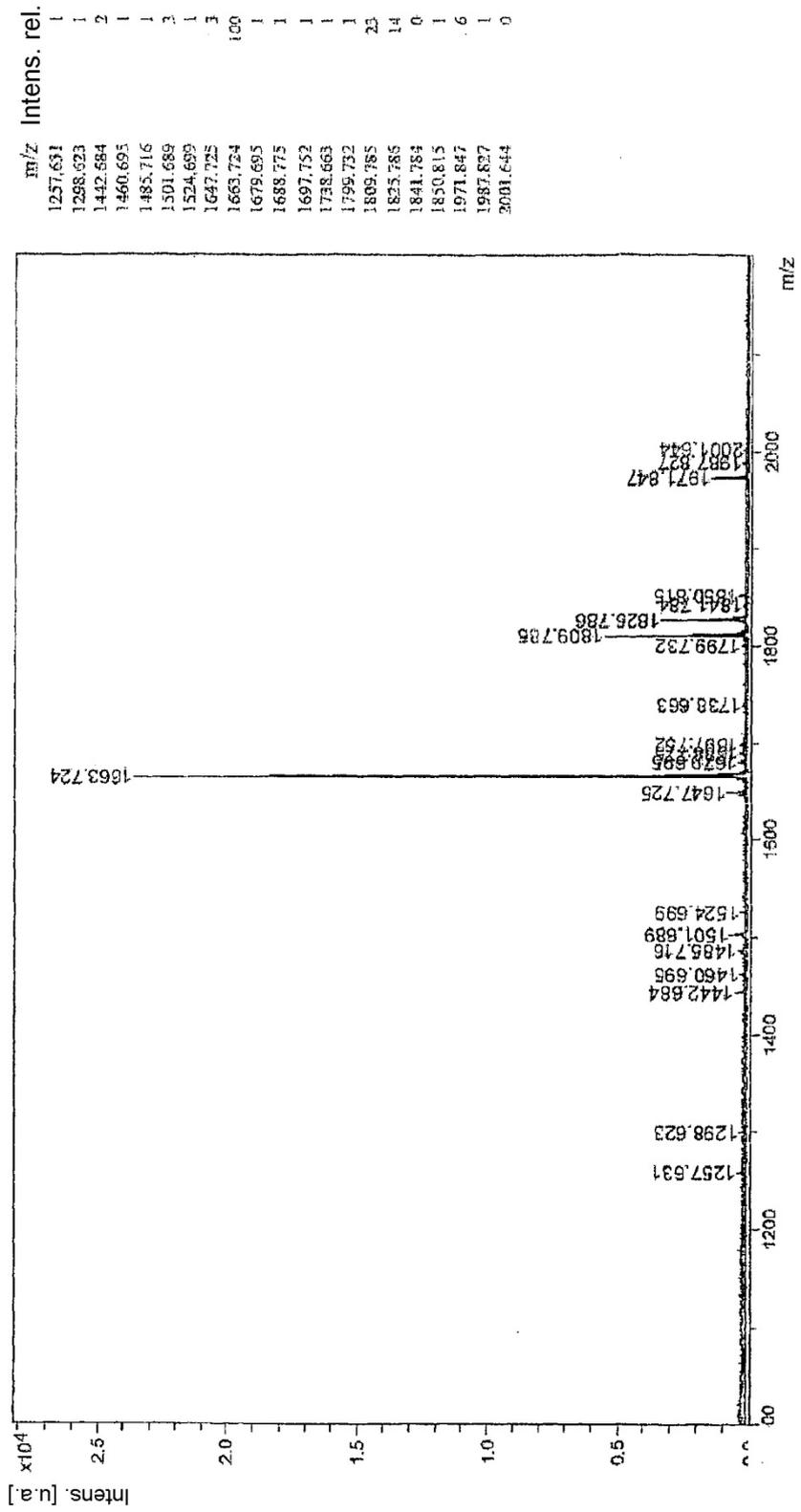


Figura 19

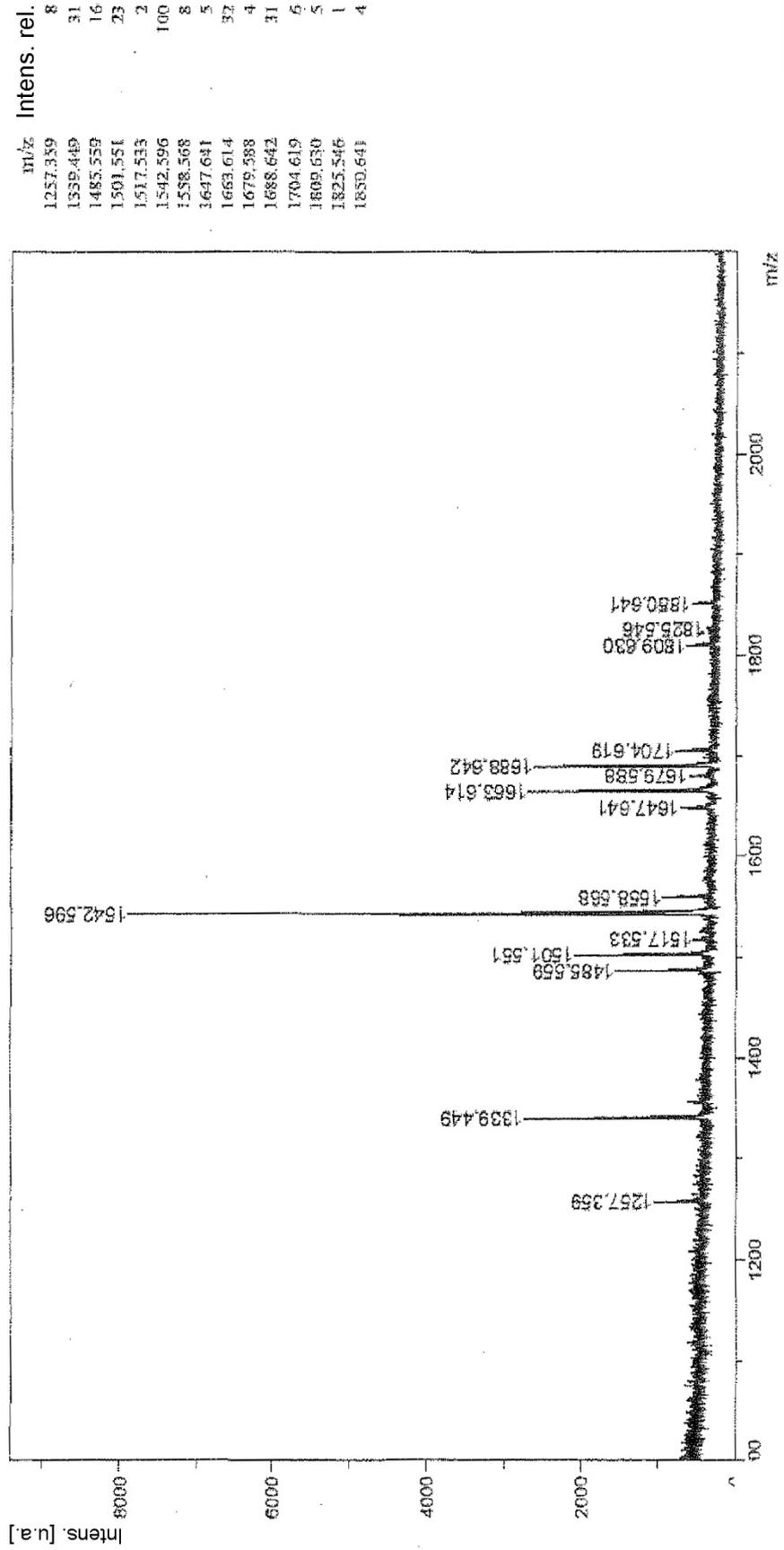


Figura 20

Unión de antic. a Fcγ₃RIII sobre la superficie de células CHO-CD16

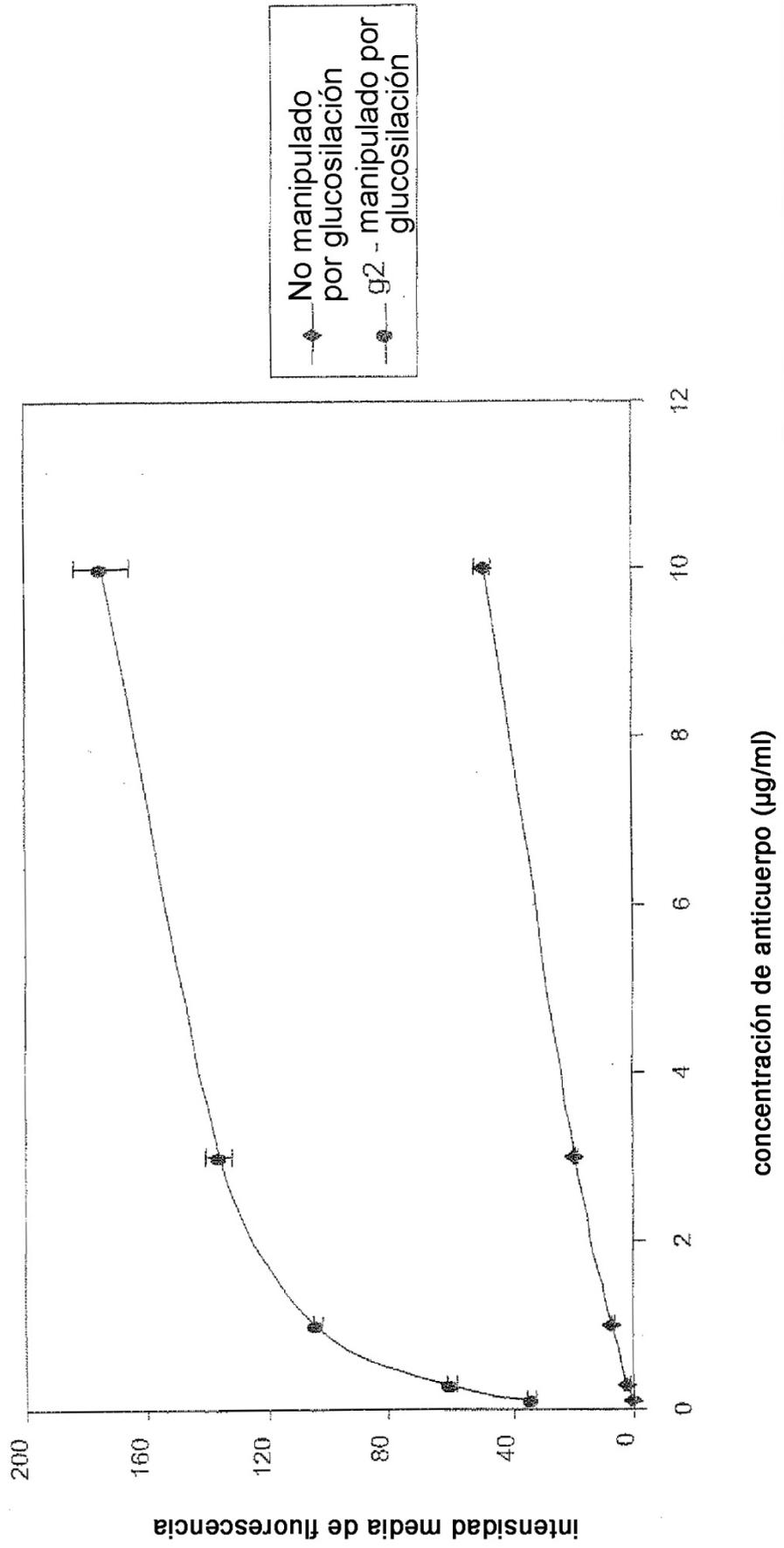


Figura 21

Apoptosis por anticuerpos anti-CD20

línea celular de linfoma de las células del manto Z-138

