

BT



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

10/11/06

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No

06-50457

54 TITULO "MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A
ANTÍGENO CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR
Fc AUMENTADA Y FUNCION EFECTORA"

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/28, A61K 39/395,
A61P 35/00.

71 SOLICITANTE GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

DOMICILIO SCHLIEREN-ZURICH, SUIZA

74 REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
TP 53 215

72 BOGOTA, D C 25 MAY 2006

(FORMA P 10)

55

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050457- -00000-0000
Rec: 2006-06-25 16:10:56 Dep. 2020 NUECREAGIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eva: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 298

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

Dirección: Waglstrasse 18, CH-8952 Schlieren-Zurich, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Schlieren-Zurich, Suiza.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3284270 Fax: 8069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3284270 Fax: 8069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: UMANA Pablo; BRÜNKER Peter; FERRARA Claudia; SUTER Tobias; PÜNTENER Ursula y MÖSSNER Ekkehard.

Dirección: Freistrasse 159, CH-8032 Zurich; Burgwiesenstrasse 3c, CH-8335 Hilttau; Hallwylstrasse 27, CH-8004, Zurich; Weiße Gasse 13, CH-5400 Baden; Weiße Gasse 13, CH-5400 Baden y Zeppelinstrasse 13, CH-8280 Kreuzlingen.

Nacionalidad o Domicilio: Suiza

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/003896Fecha: 05/11/04Publicación Internacional No. WO 2005/044859 A3Fecha: 19/05/05

⑥

Título (54)

"MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCION EFECTORA"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 35/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

05/11/03

(31) Número de Solicitud

60/517,096

⑨

Comprobante de Pago No. 06 - 36.218Fecha: 15-05-06

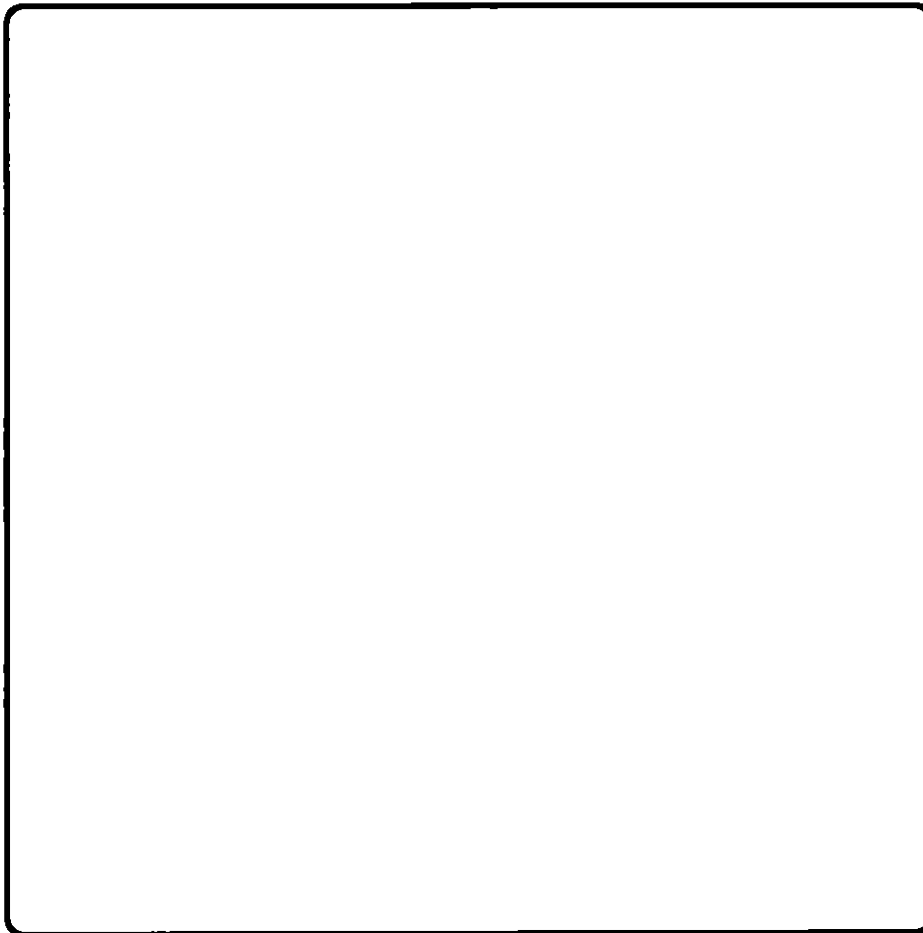
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, listado de secuencias y dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, capítulo reivindicatorio originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, opinión escrita con su traducción y anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.890.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-
Rad: 06-050457- -00000-0000
Fec: 2008-06-25 16:10:36 Dep. 2080 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Ere: 378 FASENACIONALJ
Act 411 PRESENTACION
Folios: 298

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 36,218
FECHA : MAYO 15 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47518775	15/05/2006	19,000,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

Extracto folio 3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

3

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 1975.029PC01	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/IB2004/003896	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 05/11/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 05/11/2003
Solicitante GLYCART BIOTECHNOLOGY AG		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 5 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en esta ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amina revelada en la solicitud internacional, ver Recuadro No. I.

2. ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

ANTICUERPOS CD20 CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR FC AUMENTADO Y FUNCION EFECTORA

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Folios 4 y 5 tapados

2

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2004/003896

4

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C07K16/28 A61K39/395

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Búsqueda de secuencia

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 03/011878 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG; BAILEY, SEAN LM) 13 de Febrero de 2003 (2003-02-13) parágrafos '0006! - '0009!, '0081!; reivindicaciones 1-38; ejemplos 1-4	1, 2

☒ se enumeran más documentos en la continuación de la casilla C.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica al cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'T' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

31 de Mayo de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

13/06/2005

Nombre y dirección del correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Van Klompenburg, W

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/IB2004/003896

5

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	POLYAK MARIA J ET AL: "Alanina-170 y prolina-172 son determinantes críticos para los epitopes CD20 extracelulares; la heterogeneidad en la especificidad fina de los anticuerpos monoclonales CD20 esta definida por requerimientos impuestos tanto por la secuencia de aminoácidos como por la estructura cuaternaria" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, Vol. 99 No. 9, 1 de Mayo de 2002 (2002-05-01) páginas 3256-3262, XP002308044 ISSN: 0006-4971 página 3259; tabla 2	1, 2
X	CRAGG MARK S ET AL: "Lisis mediada por complementos por anti-CD20 mAB está relacionada con la segregación dentro de acumulaciones de lípidos" BLOOD. 1 de Febrero de 2003, vol. 101, No. 3, 1 de Febrero de 2003 (2003-02-01), páginas 1045-1052, XP002329935 ISSN: 0006-4971 página 1051, columna izquierda – columna derecha	1, 2
X	DAVIES J ET AL: "La expresión de GnTIII en una línea de producción celular recombinante anti-CD20 CHO: Expresión de anticuerpos con glicoformas alterados ocasiona un incremento en ADCC por una mayor afinidad hacia FC gamma RIII" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING – COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, Vol. 74, No. 4 20 de Agosto de 2001 (2001-08-20), páginas 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592 todo el documento	1, 2
X	US 2003/003097 A1 (REFF MITCHELL E ET AL) 2 de Enero de 2003 (2003-01-02) paragrafo '0051!; reivindicaciones 1, 4	1,2
X	WO 00/67796 A (GENENTECH, INC; IDEC PHARMACEUTICALS, INC) 16 de Noviembre de 2000 (2000-11-16) reivindicaciones 1, 3, 10-12	1, 2

8

Casilla No. 1. Nucleótido y/o secuencia (s) aminoácida (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se ha establecido sobre la base de:
 - a. tipo de material:
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
 - ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
 - ☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
 - ☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.
2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
3. Comentarios adicionales:

8

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/IB2004/003896

7

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03011878	A	13-02-2003	CA 2455365 A1 13-02-2003 CN 1555411 A 15-12-2004 EP 1423510 A2 02-06-2004 WO 03011878 A2 13-02-2003 US 2003175884 A1 18-09-2003
US 2003003097	A1	02-01-2003	CA 2442801 A1 10-10-2002 EP 1383800 A1 28-01-2004 JP 2005500018 T 06-01-2005 NO 20034396 A 02-12-2003 WO 02079255 A1 10-10-2002
WO 0067796	A	16-11-2000	AU 777970 B2 04-11-2004 AU 4714300 A 21-11-2000 AU 2005200462 A1 03-03-2005 BR 0011197 A 19-02-2002 CA 2372603 A1 16-11-2000 CN 1378459 A 06-11-2002 EP 1476981 A1 06-02-2002 HU 0201009 A2 29-07-2002 JP 2002544174 T 24-12-2002 MX PA01011279 A 02-07-2002 NO 20015417 A 07-01-2002 NZ 514914 A 24-09-2004 PL 351962 A1 14-07-2003 WO 0067796 A1 16-11-2000 ZA 200108673 A 24-10-2002

7

PATENT COOPERATION TREATY

JUN 17 2005

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT K21

To:

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX
P.L.L.C.Attn. Shea Jr., Timothy J.
1100 New York Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20005
UNITED STATES OF AMERICANOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

T-M 6/21/05

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	13/06/2005
Applicant's or agent's file reference 1975.029PCP1 (1)	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/IB2004/003896	International filing date (day/month/year) 05/11/2004
Applicant GLYCART BIOTECHNOLOGY AG	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

DOCKETED

Response to Search Report 8/13/05

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rule 1.56 IDS 7/13/05 (Stat Bar 9/13/05) Marilú Masserut Australian IDS 12/13/05 Chap II Reply - Written Opinion 9/13/05 Chap I Informal Comments 6/13/05
---	---

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

11

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 16, 18 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequences if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 18, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 18 may have to be furnished to the designated/elected Office, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 1975.029PC01	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below. //	
International application No. PCT/IB2004/003896	International filing date (day/month/year) 05/11/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 05/11/2003
Applicant GLYCART BIOTECHNOLOGY AG		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 5 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 29.1(b)).



b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2.



Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3.



Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

CD20 ANTIBODIES WITH INCREASED FC RECEPTOR BINDING AFFINITY AND EFFECTOR FUNCTION

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.



b. none of the figures is to be published with the abstract.

INTL NATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/003896

12

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/28 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/011878 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG; BAILEY, SEAN LM) 13 February 2003 (2003-02-13) paragraphs '0006! - '0009!, '0081!; claims 1-38; examples 1-4 ----- -/--	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- 'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 May 2005

Date of mailing of the international search report

13/06/2005

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POLYAK MARIA J ET AL: "Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 99, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 3256-3262, XP002308044 ISSN: 0006-4971 page 3259; table 2	1,2
X	CRAGG MARK S ET AL: "Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts." BLOOD. 1 FEB 2003, vol. 101, no. 3, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 1045-1052, XP002329935 ISSN: 0006-4971 page 1051, left-hand column - right-hand column	1,2
X	DAVIES J ET AL: "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, 20 August 2001 (2001-08-20), pages 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592 the whole document	1,2
X	US 2003/003097 A1 (REFF MITCHELL E ET AL) 2 January 2003 (2003-01-02) paragraph '0051!; claims 1,4	1,2
X	WO 00/67796 A (GENENTECH, INC; IDEC PHARMACEUTICALS, INC) 16 November 2000 (2000-11-16) claims 1,3,10-12	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2004/003896

14

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

77
78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2004/003896

15

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03011878	A	13-02-2003	CA 2455365 A1	13-02-2003
			CN 1555411 A	15-12-2004
			EP 1423510 A2	02-06-2004
			WO 03011878 A2	13-02-2003
			US 2003175884 A1	18-09-2003
US 2003003097	A1	02-01-2003	CA 2442801 A1	10-10-2002
			EP 1383800 A1	28-01-2004
			JP 2005500018 T	06-01-2005
			NO 20034396 A	02-12-2003
			WO 02079255 A1	10-10-2002
WO 0067796	A	16-11-2000	AU 777970 B2	04-11-2004
			AU 4714300 A	21-11-2000
			AU 2005200462 A1	03-03-2005
			BR 0011197 A	19-02-2002
			CA 2372603 A1	16-11-2000
			CN 1378459 A	06-11-2002
			EP 1176981 A1	06-02-2002
			HU 0201009 A2	29-07-2002
			JP 2002544174 T	24-12-2002
			MX PA01011279 A	02-07-2002
			NO 20015417 A	07-01-2002
			NZ 514914 A	24-09-2004
			PL 351962 A1	14-07-2003
			WO 0067796 A1	16-11-2000
			ZA 200108673 A	24-10-2002

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación
19 de Mayo de 2005 (19.05.2005)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2005/044859 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes¹: C07K 16/28, A61K 39/395
(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/IB2004/003896
(22) Fecha de Registro Internacional: 5 de Noviembre de 2004 (05.11.2004)
(25) Idioma de registro: INGLES
(26) Idioma de Publicación: INGLES
(30) Información de Prioridad: 60/517,096 5 de Noviembre de 2003 (05.11.2003) US
(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto EU): GLYCART BIOTECHNOLOGY AG [CH/CH]; Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren-Zurich (CH).

(81) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado, para cada clase de la protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado, para cada clase de la protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventor: e
(75) Inventor/solicitante: (para EU solamente): UMANA, Pablo [CR/CH]; Freistrasse 159, CH-8032 Zurich (CH). BRÜNKER, Peter [DE/CH]; Burgwiesenstrasse 3c, CH-8335 Hittnau (CH). FERRARA, Claudia [CH/CH]; Hallwylstrasse 27, CH-8004, Zurich (CH). SUTER, Tobias [CH/CH]; Weite Gasse 13, CH-5400 Baden (CH). PÜNTENER, Ursula [CH/CH]; Weite Gasse 13, CH-5400 Baden (CH). MÖSSNER, Ekkehard [DE/CH]; Zeppelinstrasse 13, CH-8280 Kreuzlingen (CH).

Publicado:
— con reporte de búsqueda internacional
— Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones
(88) Fecha de la publicación del reporte de búsqueda internacional: 4 de Agosto de 2005

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gúlas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "ANTICUERPOS CD20 CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR FC AUMENTADO Y FUNCION EFECTORA"

(57) Resumen: La presente invención está relacionada con moléculas que se enlazan a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales recombinantes, que incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales ABMs, y con los vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La invención se relaciona además con métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos para usar estas ABMs en el tratamiento de enfermedad. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con ABMs con glicosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con enlace al receptor Fc aumentado y función efectora aumentada.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 May 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/044859 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/28, A61K 39/395

(21) International Application Number: PCT/IB2004/003896

(22) International Filing Date: 5 November 2004 (05.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/517,096 5 November 2003 (05.11.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GLY-CART BIOTECHNOLOGY AG [CH/CH]; Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren-Zurich (CH).

(71) Applicants and

(72) Inventors: UMANA, Pablo [CH/CH]; Freistrasse 159, CH-8032 Zurich (CH). BRÜNKER, Peter [DE/CH]; Burgwiesenstrasse 3c, CH-8335 Hittnau (CH). FER-RARA, Claudia [CH/CH]; Hallwylstrasse 27, CH-8004 Zurich (CH). SUTER, Tobias [CH/CH]; Weite Gasse 13, CH-5400 Baden (CH). PÜNTENER, Ursula [CH/CH]; Weite Gasse 13, CH-5400 Baden (CH). MÖSSNER, Ekkehard [DE/CH]; Zeppelinstrasse 13, CH-8280 Kreuzlingen (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HN, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 4 August 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CD20 ANTIBODIES WITH INCREASED FC RECEPTOR BINDING AFFINITY AND EFFECTOR FUNCTION

(57) Abstract: The present invention relates to antigen binding molecules (ABMs). In particular embodiments, the present invention relates to recombinant monoclonal antibodies, including chimeric, primatized or humanized antibodies specific for human CD20. In addition, the present invention relates to nucleic acid molecules encoding such ABMs, and vectors and host cells comprising such nucleic acid molecules. The invention further relates to methods for producing the ABMs of the invention, and to methods of using these ABMs in treatment of disease. In addition, the present invention relates to ABMs with modified glycosylation having improved therapeutic properties, including antibodies with increased Fc receptor binding and increased effector function.

WO 2005/044859 A3

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU
TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende
 - a. una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO : 7; y
 - b. una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO:21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; y
 - c. secuencia ID NO : 24.
2. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10.
3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que codifica un polipéptido de fusión.
4. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID No.: 3.
5. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID No.: 4.
6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
8. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 4, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
9. Un polinucleótido aislado que comprende
 - a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento del, de una especie diferente a la de ratón.

10. Un polinucleótido aislado que comprende

a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

11. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No. : 1.

12. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2.

13. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO. : 11.

14. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO.: 12.

15. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO.: 12.

16. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

17. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

18. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

19. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a la SEQ ID NO.:11 o a la SEQ ID NO.:12.

20. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:13 (cadena pesada aa).
21. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:14 (cadena ligera aa).
22. Un polinucleótido aislado que comprende
- a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región V_H del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes del mismo; y
 - b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.
23. Un polinucleótido aislado que comprende
- a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región V_L del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes del mismo; y
 - b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.
24. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23.
25. El vector de la reivindicación 24, en donde dicho vector es policistrónico.
26. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 24.
27. Una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23.

28. Un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 de murina y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.
29. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido de la reivindicación 28.
30. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 29, que se enlaza a CD20 humano.
31. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 29, que es un anticuerpo.
32. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo quimérico.
33. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo humanizado.
34. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo primatizado.
35. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma.
36. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO : 2 o una variante de la misma.
37. Un polipéptido quimérico que comprende:
- a. un polipéptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO: 17; y
 - b. un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27; y
 - c. SEQ ID NO: 28.

38. Un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 37, que además comprende un marco de región variable de cadena pesada, e donde dicho marco comprende un residuo de alanina en la posición 71, de acuerdo a la numeración Kabat.
39. Un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 37, que comprende además un marco de región variable de cadena pesada, en donde dicho marco comprende un residuo de arginina en la posición 94, de acuerdo con la numeración Kabat.
40. Un polipéptido quimérico que comprende la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 20.
41. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO:13 o una variante de la misma.
42. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 14 o una variante de la misma.
43. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-40, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.
44. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 43.
45. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.
46. El anticuerpo de la reivindicación 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo primatizado.
47. El anticuerpo de la reivindicación 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
48. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en

donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

49. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 48, en donde dicho fragmento de anticuerpo es primatizado.

50. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 48, en donde dicho fragmento de anticuerpo es humanizado.

51. Una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es quimérica.

52. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

53. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 52, en donde dicho anticuerpo es primatizado.

54. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicho anticuerpo recombinante es humanizado.

55. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicho anticuerpo recombinante comprende una Región Fc humana.

56. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 55, en donde dicha Región Fc humana es la Región Fc de IgG humana.

57. Una molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 29-34 o 44-56, dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene una Región Fc con oligosacáridos modificados.

58. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicha Región Fc ha sido modificada para tener residuos de mucosa reducidos comparados con molécula que se enlaza a antígeno no modificada.

59. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicha Región Fc tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados.

60. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 59, en donde dichos oligosacáridos modificados con complejos, bisecados.

61. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados, bisecados en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno.

62. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados, bisecados son híbridos.

63. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados, bisecados son complejos.

64. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

65. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

66. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

67. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

68. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 humano, y en donde dicha molécula de enlace a antígeno es quimérica; dicho método comprende

a. cultivar la célula huésped de la reivindicación 26 o reivindicación 27 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b. recuperar dicha molécula que se enlaza a antígeno del cultivo resultante.

69. El método de la reivindicación 68, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

70. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-34 o 46-67 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

71. La composición farmacéutica de la reivindicación 70, en donde dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

72. La composición farmacéutica de la reivindicación 70, en donde dicha composición comprende además un adyuvante.

73. Un método para tratar un trastorno tratable por la depleción de célula B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 70-72 a un sujeto humano en necesidad del mismo.

74. Una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de un polipéptido producido por dicha célula

huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 44-67.

75. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

76. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

77. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

78. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región equivalente a la Región Fc de un IgG humano.

79. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada como resultado de dicha modificación.

80. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe función efectora aumentada como resultado de dicha modificación.

81. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 75, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

82. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 75, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

83. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 82, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II.

84. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 82, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1, 2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

85. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 82, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1, 2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

86. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 82, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa I.

87. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 82, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo $\alpha 1-6$.

88. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

89. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

90. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

91. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

92. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos.

93. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde

dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

94. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

95. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 80, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

96. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicho receptor Fc es el receptor de activación Fcγ.

97. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIA.

98. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma P3X63 de ratón, una célula PER, una célula PER. C6 o una célula de hibridoma.

99. La célula huésped de la reivindicación 74, que comprende además al menos un polinucleótido transfectado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 y 35-41, y en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina humana.

100. La célula huésped de la reivindicación 74, en donde dicho al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, está operablemente unido a un elemento promotor constitutivo.

101. La célula huésped de la reivindicación 100, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

102. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno que tiene oligosacáridos modificados en una célula huésped, dicho método comprende:

a. cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1, 4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permiten la producción de dicha molécula que se enlaza a antígeno, y que permite la modificación de los oligosacáridos presentes en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b. aislar dicha molécula que se enlaza a antígeno, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20, y en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno o fragmento de la misma es quimérica.

103. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparados con oligosacáridos no modificados.

104. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dichos oligosacáridos modificados son híbridos.

105. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dichos oligosacáridos modificados son complejos.

106. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde dicho anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por dicha célula huésped tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la Región Fc de dicho polipéptido.

107. Un método de acuerdo con la reivindicación 106, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son híbridos.

108. Un método de acuerdo con la reivindicación 106, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son complejos.

109. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

110. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

111. Un método de acuerdo con la reivindicación 102, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

112. Una molécula que se enlaza a antígeno diseñada para tener función efectora aumentada producida mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 102-111.

113. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 112, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

114. Un anticuerpo diseñado para tener afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, producido mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 102-111.

115. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 114, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

116. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

117. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

118. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

119. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos.

120. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

121. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

122. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

123. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 112, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

124. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 114, en donde dicho receptor es el receptor Fc receptor es el receptor que activa Fc.

125. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 114, en donde dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIa.

126. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 102 a 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo que contiene la Región Fc, y diseñado para tener función efectora aumentada.

127. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 102 a 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:1 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

128. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 102 a 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQID No : 70; y SEQ ID No : 72, y una región equivalente a la Región Fc de una Inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

129. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 102 a 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:3 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

130. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 102 a 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 76 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

131. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 112 a 130 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

132. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 126 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

133. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 127 a 130 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

134. Un método para el tratamiento de un trastorno tratable mediante depleción de célula B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del antígeno de enlace de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 112 a 130 a un sujeto humano en necesidad del mismo.

135. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 que comprende además una secuencia que codifica una región constante de cadena ligera o pesada de anticuerpo humano.

136. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia con al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 24, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

137. Un célula huésped que coexpresa un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 136 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de una cadena ligera de anticuerpo.

138. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

139. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

140. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

141. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 80% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

142. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 90% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

143. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

144. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

145. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

146. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 75% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

147. Un método de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicho trastorno es un linfoma de célula B.

148. Un polinucleótidoaislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

149. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 148, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 31.

150. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 148, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 55.

151. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 148, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 59.

152. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No: 75.

153. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 148 o 149, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

154. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 56; y SEQ ID NO: 60; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 76

155. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No: 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

156. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 75, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

157. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

158. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a la SEQ ID No: 75.

159. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No: 29; SEQ D No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

160. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a la SEQ ID No: 75.

161. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

162. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a la SEQ ID No: 75.

163. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

164. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a la SEQ ID No: 75.

165. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72 ; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

166. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID No: 76; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

167. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una

secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72.

168. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No: 76.

169. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72.

170. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO : 76.

171. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 148-170.

172. El vector de la reivindicación 171, en donde dicho vector es policistrónico.

173. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 171.

174. Una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 148-170.

175. Un polipéptido humanizado que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50;

SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID NO : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72, o una variante de la misma.

176. Un polipéptido humanizado que comprende la secuencia de SEQ ID NO : 76, o una variante de la misma.

177. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72, o una variante de la misma.

178. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO : 76, o una variante de la misma.

179. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 177-178, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

180. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 179.

181. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 180, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

182. El anticuerpo de la reivindicación 181, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

183. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 180, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

184. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 183, en donde dicho fragmento de anticuerpo es humanizado.

185. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 180, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo recombinante.

186. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 185, en donde dicho anticuerpo recombinante es humanizado.

187. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 180, en donde dicho anticuerpo recombinante comprende una Región Fc humana.

188. La molécula que se enlaza a antígeno of reivindicación 187, en donde dicha Región Fc humana es una Región Fc de IgG humano.

189. Una molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 180-188, dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene una Región Fc con oligosacáridos modificados.

190. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde dicha Región Fc ha sido modificada para tener residuos de mucosa reducidos comparados con molécula que se enlaza a antígeno no modificada.

191. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde dicha Región Fc tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados.

192. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde dichos oligosacáridos modificados son bisecados complejos.

193. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados no fucosilados en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno.

194. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 193, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son híbridos.

195. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 193, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son complejos.

196. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

197. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

198. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

199. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

200. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 humano, y en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es quimérica; dicho método comprende

a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 173 o reivindicación 174 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b) recuperar dicha molécula que se enlaza a antígeno.

201. El método de la reivindicación 200, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

202. El método de la reivindicación 200, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno quimérica es humanizada.

203. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 189-199 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

204. La composición farmacéutica de la reivindicación 203, en donde dicha composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

205. La composición farmacéutica de la reivindicación 203, en donde dicha composición comprende además un adyuvante.

206. Un método para tratar un trastorno tratable mediante depleción de célula B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 203-205 a un sujeto humano en necesidad del mismo.

207. Una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de un polipéptido producido por dicha célula huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 180-197.

208. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

209. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

210. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

211. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región equivalente a la Región Fc de un IgG humano.

212. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada como resultado de dicha modificación.

213. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe función efectora aumentada como resultado de dicha modificación.

214. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 208, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

215. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 208, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

216. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 215, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II.

217. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 215, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

218. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 215, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

219. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 215, en donde

dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa I.

220. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 215, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α 1-6.

221. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

222. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

223. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

224. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

225. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos

226. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

227. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

228. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 213, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

229. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 212, en donde dicho receptor Fc es el receptor que activa Fcγ.

230. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 212, en donde dicho receptor Fc es receptor FcγRIIIA.

231. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 207, en donde dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma P3X63 de ratón, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma.

232. La célula huésped de la reivindicación 207, que comprende además al menos un polinucleótido transfectado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 y 35-41, y en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina humana.

233. La célula huésped de la reivindicación 207, en donde dicho al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, está operablemente unido a un elemento promotor constitutivo.

234. La célula huésped de la reivindicación 233, en donde dicho polipéptido que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

235. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

236. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

237. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 189, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

238. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 80% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

239. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 90% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

240. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

241. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

242. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

243. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 75% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

244. Un método de acuerdo con la reivindicación 206, en donde dicho trastorno es un linfoma de célula B.

245. Un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o troncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

246. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 245, en donde dicha región determinante de complementariedad se selecciona del grupo consistente de: [LISTA TOTAL DE LAS SECUENCIAS DE CDR DE B-Ly1].

247. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 245, en donde dicho polinucleótido aislado codifica una molécula que se enlaza a antígeno.

248. Un polinucleótido aislado que comprende al menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

249. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 248, en donde dichas regiones determinantes de complementariedad comprenden al menos una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 y SEQ ID NO : 7; y al menos una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO : 22, y SEQ ID NO : 23; y la SEQ ID NO : 24, o formas variantes o truncadas de dichas secuencias que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

250. Un polipéptido aislado codificado por los polinucleótidos aislados de cualquiera de las reivindicaciones 245-249.

251. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de complementariedad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprende además una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.

252. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 251, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende al menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

253. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 252, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo.

254. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 252, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado.

255. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado que tienen ADCC aumentada como resultado de tal diseño sin pérdida sustancial de habilidad para inducir apoptosis de células objetivo.

256. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 255, en donde dicho anticuerpo ha sido diseñado para tener un patrón alterado de glicosilación en la Región Fc.

257. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 256, en donde dicha glicosilación alterada es un aumento en la cantidad de oligosacáridos bisecados complejos.

258. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 256, en donde dicha glicosilación alterada es una disminución en la cantidad de residuos de fucosa.

259. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 255, en donde dicho anticuerpo ha sido diseñado para tener una secuencia de amino ácido alterada en la Región Fc.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide comprising
 - a. a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO.:5, SEQ ID NO.: 6 and SEQ ID NO:7; and
 - b. a sequence selected from the group consisting of:SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 and SEQ ID NO:23; and
 - c. sequence ID NO:24.
2. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.: 9 and SEQ ID NO.:10.
3. An isolated polynucleotide according to claim 1 or claim 2, which encodes a fusion polypeptide.
4. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID No.:3.
5. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID No.:4.
6. An isolated polynucleotide according to claim 4 or 5, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.
7. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 80% identity to SEQ ID NO:3, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.
8. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 80% identity to SEQ ID NO:4, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

-95-

9. An isolated polynucleotide comprising
 - a. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No.:1; and
 - b. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.
10. An isolated polynucleotide comprising
 - a. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No.:2; and
 - b. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.
11. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No.:1.
12. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No.:2.
13. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID NO.: 11.
14. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID NO.: 12.
15. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 80% identity to SEQ ID NO.:11 or to SEQ ID NO.:12.
16. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 85% identity to SEQ ID NO.:11 or to SEQ ID NO.:12.
17. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 90% identity to SEQ ID NO.:11 or to SEQ ID NO.:12.

54

18. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 95% identity to SEQ ID NO.:11 or to SEQ ID NO.:12.
19. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 99% identity to SEQ ID NO.:11 or to SEQ ID NO.:12.
20. An isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide having SEQ ID NO:13 (heavy chain aa).
21. An isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide having SEQ ID NO:14 (light chain aa).
22. An isolated polynucleotide comprising
 - a. a sequence encoding a polypeptide having the V_H region of the murine B-Ly1 antibody, or variants thereof; and
 - b. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.
23. An isolated polynucleotide comprising
 - a. a sequence encoding a polypeptide having the V_L region of the murine B-Ly1 antibody, or variants thereof; and
 - b. a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.
24. An expression vector comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 1-23.
25. The vector of claim 24, wherein said vector is polycistronic.
26. A host cell comprising the expression vector of claim 24.

-97-

27. A host cell comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 1-23.
28. A polypeptide comprising a sequence derived from the murine B-Ly1 antibody and a sequence derived from a heterologous polypeptide.
29. An antigen-binding molecule comprising the polypeptide of claim 28.
30. An antigen-binding molecule according to claim 29, which binds human CD20.
31. An antigen-binding molecule according to claim 29, which is an antibody.
32. An antigen-binding molecule according to claim 31, which is a chimeric antibody.
33. An antigen-binding molecule according to claim 31, which is a humanized antibody.
34. An antigen-binding molecule according to claim 31, which is a primatized antibody.
35. A chimeric polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:1 or a variant thereof.
36. A chimeric polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:2 or a variant thereof.
37. A chimeric polypeptide comprising:
a. a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO: 17; and

b. a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO: 27; and

c. SEQ ID NO:28.

38. A chimeric polypeptide according to claim 37, further comprising a heavy chain variable region framework, wherein said framework comprises an alanine residue at position 71, according to Kabat numbering.

39. A chimeric polypeptide according to claim 37, further comprising a heavy chain variable region framework, wherein said framework comprises an arginine residue at position 94, according to Kabat numbering.

40. A chimeric polypeptide comprising SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 and SEQ ID NO: 20.

41. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:13 or a variant thereof.

42. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:14 or a variant thereof.

43. The isolated polypeptide according to any of claims 35-40; wherein said polypeptide is a fusion polypeptide.

44. An antigen binding molecule comprising the isolated polypeptide of claim 43.

45. The antigen binding molecule of claim 44, wherein said antigen binding molecule is an antibody.

46. The antibody of claim 45, wherein said antibody is a primatized antibody.

47. The antibody of claim 45, wherein said antibody is a humanized antibody.

-99-

48. The antigen binding molecule of claim 44, wherein said antigen binding molecule is an antibody fragment.
49. The antibody fragment of claim 48, wherein said antibody fragment is primatized.
50. The antigen binding molecule of claim 48, wherein said antibody fragment is humanized.
51. An antigen binding molecule, which is capable of competing with the murine B-Ly1 antibody for binding to CD20, wherein said antigen binding molecule is chimeric.
52. The antigen binding molecule of claim 51, wherein said antigen binding molecule is an antibody.
53. The antigen binding molecule of claim 52, wherein said antibody is primatized.
54. The antigen binding molecule of claim 51, wherein said recombinant antibody is humanized.
55. The antigen binding molecule of claim 51, wherein said recombinant antibody comprises a human Fc region.
56. The antigen binding molecule of claim 55, wherein said human Fc region is a human IgG Fc region.
57. An antigen binding molecule of any of claims 29-34 or 44-56, said antigen binding molecule having an Fc region with modified oligosaccharides.

-100-

58. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein said Fc region has been modified to have reduced fucose residues as compared to non-modified antigen binding molecule.

59. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein said Fc region has an increased proportion of bisected oligosaccharides.

60. An antigen binding molecule according to claim 59, wherein said modified oligosaccharides are bisected complex.

61. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein said modified oligosaccharides have an increased proportion of bisected, nonfucosylated oligosaccharides in the Fc region of said antigen binding molecule.

62. An antigen binding molecule according to claim 61, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are hybrid.

63. An antigen binding molecule according to claim 61, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are complex.

64. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 20% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

65. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 30% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

66. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 35% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

67. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.
68. A method of producing an antigen binding molecule, which is capable of competing with the murine B-Ly1 antibody for binding to human CD20, and wherein said antigen binding molecule is chimeric; said method comprising
- a. culturing the host cell of claim 26 or claim 27 in a medium under conditions allowing the expression of said polynucleotide encoding said antigen binding molecule; and
 - b. recovering said antigen binding molecule from the resultant culture.
69. The method of claim 68, wherein said antigen binding molecule is an antibody.
70. A pharmaceutical composition comprising the antigen binding molecule according to any of claims 29-34 or 46-67 and a pharmaceutically acceptable carrier.
71. The pharmaceutical composition of claim 70, wherein said composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier.
72. The pharmaceutical composition of claim 70, wherein said composition further comprises an adjuvant.
73. A method of treating a disorder treatable by B-cell depletion comprising administering a therapeutically effective amount of pharmaceutical composition of any of claims 70-72 to a human subject in need thereof.
74. A host cell engineered to express at least one nucleic acid encoding a polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity in an

-102-

amount sufficient to modify the oligosaccharides in the Fc region of a polypeptide produced by said host cell, wherein said polypeptide is an antigen binding molecule according to any of claims 44-67.

75. The host cell of claim 74, wherein said polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity is a fusion polypeptide.

76. The host cell of claim 74, wherein said antigen binding molecule is an antibody.

77. The host cell of claim 74, wherein said antigen binding molecule is an antibody fragment.

78. The host cell of claim 74, wherein said antigen binding molecule comprises a region equivalent to the Fc region of a human IgG.

79. The host cell of claim 74, wherein said antigen binding molecule produced by said host cell exhibits increased Fc receptor binding affinity as a result of said modification.

80. The host cell of claim 74, wherein said antigen binding molecule produced by said host cell exhibits increased effector function as a result of said modification.

81. A host cell according to claim 75, wherein said fusion polypeptide comprises the catalytic domain of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III.

82. A host cell according to claim 75, wherein said fusion polypeptide further comprises the Golgi localization domain of a heterologous Golgi resident polypeptide.

62

83. A host cell according to claim 82, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of mannosidase II.
84. A host cell according to claim 82, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\beta(1,2)$ -N-acetylglucosaminyltransferase I.
85. A host cell according to claim 82, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\beta(1,2)$ -N-acetylglucosaminyltransferase II.
86. A host cell according to claim 82, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of mannosidase I.
87. A host cell according to claim 82, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\alpha 1$ -6 core fucosyltransferase.
88. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased Fc-mediated cellular cytotoxicity.
89. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased binding to NK cells.
90. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased binding to macrophages.
91. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased binding to polymorphonuclear cells.
92. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased binding to monocytes.
93. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased direct signaling inducing apoptosis.

94. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased dendritic cell maturation.

95. A host cell according to claim 80, wherein said increased effector function is increased T cell priming.

96. A host cell according to claim 79, wherein said Fc receptor is Fcγ activating receptor.

97. A host cell according to claim 79, wherein said Fc receptor is FcγRIIIA receptor.

98. A host cell according to claim 74, wherein said host cell is a CHO cell, a BHK cell, a NSO cell, a SP2/0 cell, a YO myeloma cell, a P3X63 mouse myeloma cell, a PER cell, a PER.C6 cell or a hybridoma cell.

99. The host cell of claim 74, further comprising at least one transfected polynucleotide encoding a polypeptide according to any of claims 28 and 35-41, and wherein said nucleic acid comprises a sequence encoding a region equivalent to the Fc region of a human immunoglobulin.

100. The host cell of claim 74, wherein said at least one nucleic acid encoding a polypeptide having β(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III activity is operably linked to a constitutive promoter element.

101. The host cell of claim 100, wherein said polypeptide having β(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III activity is a fusion polypeptide.

102. A method for producing an antigen binding molecule having modified oligosaccharides in a host cell, said method comprising:

-105-

a. culturing a host cell engineered to express at least one nucleic acid encoding a polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity under conditions which permit the production of said antigen binding molecule, and which permit the modification of the oligosaccharides present on the Fc region of said antigen binding molecule; and

b. isolating said antigen binding molecule wherein said antigen binding molecule is capable of competing with the murine B-Ly1 antibody for binding to CD20 and wherein said antigen binding molecule or fragment thereof is chimeric.

103. A method according to claim 102, wherein said modified oligosaccharides have reduced fucosylation as compared to non-modified oligosaccharides.

104. A method according to claim 102, wherein said modified oligosaccharides are hybrid.

105. A method according to claim 102, wherein said modified oligosaccharides are complex.

106. A method according to claim 102, wherein said recombinant antibody or fragment thereof produced by said host cell has an increased proportion of bisected, nonfucosylated oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide.

107. A method according to claim 106, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are hybrid.

108. A method according to claim 106, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are complex.

109. A method according to claim 102, wherein at least 20% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

110. A method according to claim 102, wherein at least 30% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

111. A method according to claim 102, wherein at least 35% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

112. An antigen binding molecule engineered to have increased effector function produced by the method according to any one of claims 102-111.

113. The antigen binding molecule of claim 112, wherein said antigen binding molecule is an antibody

114. An antibody engineered to have increased Fc receptor binding affinity produced by the method of any one of claims 102-111.

115. The antigen binding molecule of claim 114, wherein said antigen binding molecule is an antibody.

116. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased Fc-mediated cellular cytotoxicity.

117. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased binding to NK cells.

118. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased binding to macrophages.

119. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased binding to monocytes.

65

-107-

120. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased binding to polymorphonuclear cells.

121. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is direct signaling inducing apoptosis.

122. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased dendritic cell maturation.

123. An antigen binding molecule according to claim 112, wherein said increased effector function is increased T cell priming.

124. An antigen binding molecule according to claim 114, wherein said Fc receptor is Fc activating receptor.

125. An antigen binding molecule according to claim 114, wherein said Fc receptor is FcγRIIIa receptor.

126. An antigen binding molecule produced by the method of any of claims 102 to 111, wherein said antigen binding molecule is an antibody fragment containing the Fc region and engineered to have increased effector function.

127. An antigen binding molecule produced by the method of any of claims 102 to 111, wherein said antigen binding molecule is a fusion protein that includes a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:1 and a region equivalent to the Fc region of an immunoglobulin and engineered to have increased effector function.

128. An antigen binding molecule produced by the method of any of claims 102 to 111, wherein said antigen binding molecule is a fusion protein that includes a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38;

-108-

SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72, and a region equivalent to the Fc region of an immunoglobulin and engineered to have increased effector function.

129. An antigen binding molecule produced by the method of any of claims 102 to 111, wherein said antigen binding molecule is a fusion protein that includes a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:3 and a region equivalent to the Fc region of an immunoglobulin and engineered to have increased effector function.

130. An antigen binding molecule produced by the method of any of claims 102 to 111, wherein said antigen binding molecule is a fusion protein that includes a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:76 and a region equivalent to the Fc region of an immunoglobulin and engineered to have increased effector function.

131. A pharmaceutical composition comprising the antigen binding molecule of any of claims 112 to 130 and a pharmaceutically acceptable carrier.

132. A pharmaceutical composition comprising the antibody fragment of claim 126 and a pharmaceutically acceptable carrier.

133. A pharmaceutical composition comprising the fusion protein of any of claims 127 to 130 and a pharmaceutically acceptable carrier.

134. A method of treating a disease treatable by B-cell depletion comprising administering a therapeutically effective amount of the antigen binding according to any of claims 112 to 130 to a human subject in need thereof.

135. An isolated polynucleotide according to claim 4 or 5 further comprising a sequence encoding a human antibody light or heavy chain constant region.

136. An isolated polynucleotide comprising a sequence with at least 80% identity to SEQ ID NO:24, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

137. A host cell coexpressing an isolated polynucleotide according to claim 136 and a polynucleotide comprising a sequence encoding the variable region of an antibody light chain.

138. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 50% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

139. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 60% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

140. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

141. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 80% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

142. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 90% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

143. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 50% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

144. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 60% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

-110-

145. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

146. An antigen binding molecule according to claim 57, wherein at least 75% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

147. A method according to claim 73, wherein said disorder is a B cell lymphoma.

148. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71.

149. An isolated polynucleotide according to claim 148, wherein said isolated polynucleotide comprises SEQ ID NO:31.

150. An isolated polynucleotide according to claim 148, wherein said isolated polynucleotide comprises SEQ ID NO:55.

151. An isolated polynucleotide according to claim 148, wherein said isolated polynucleotide comprises SEQ ID NO:59.

152. An isolated polynucleotide comprising SEQ ID No:75.

153. An isolated polynucleotide according to claim 148 or 149, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

154. An isolated polynucleotide comprising

69

-111-

a) a sequence encoding a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:56; and SEQ ID NO:60; and

b) a sequence encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:76

155. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 80% identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

156. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 80% identity to SEQ ID NO:75, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

157. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 85% identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71.

158. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 85% identity to SEQ ID No: 75.

159. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 90% identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ

-112-

ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71.

160. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 90% identity to SEQ ID No: 75.

161. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 95% identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71.

162. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 95% identity to SEQ ID No: 75.

163. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 99% identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; and SEQ ID No:71.

164. An isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 99% identity to SEQ ID No: 75.

-113-

165. An isolated polynucleotide comprising

a) a sequence encoding a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72; and

b) a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.

166. An isolated polynucleotide comprising

a) a sequence encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No:76; and

b) a sequence encoding a polypeptide having the sequence of an antibody Fc region, or a fragment thereof, from a species other than mouse.

167. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72.

168. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide having the sequence of SEQ ID No:76.

169. An isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID

-114-

No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72.

170. An isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide having SEQ ID NO:76.

171. An expression vector comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 148-170.

172. The vector of claim 171, wherein said vector is polycistronic.

173. A host cell comprising the expression vector of claim 171.

174. A host cell comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 148-170.

175. A humanized polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72, or a variant thereof.

176. A humanized polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO:76, or a variant thereof.

177. An isolated polypeptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; and SEQ ID No:72, or a variant thereof.

178. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:76, or a variant thereof.
179. The isolated polypeptide according to any of claims 177-178, wherein said polypeptide is a fusion polypeptide.
180. An antigen binding molecule comprising the isolated polypeptide of claim 179.
181. The antigen binding molecule of claim 180, wherein said antigen binding molecule is an antibody.
182. The antibody of claim 181, wherein said antibody is a humanized antibody.
183. The antigen binding molecule of claim 180, wherein said antigen binding molecule is an antibody fragment.
184. The antigen binding molecule of claim 183, wherein said antibody fragment is humanized.
185. The antigen binding molecule of claim 180, wherein said antigen binding molecule is a recombinant antibody.
186. The antigen binding molecule of claim 185, wherein said recombinant antibody is humanized.
187. The antigen binding molecule of claim 180, wherein said recombinant antibody comprises a human Fc region.
188. The antigen binding molecule of claim 187, wherein said human Fc region is a human IgG Fc region.
- 72

189. An antigen binding molecule of any of claims 180-188, said antigen binding molecule having an Fc region with modified oligosaccharides.

190. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein said Fc region has been modified to have reduced fucose residues as compared to non-modified antigen binding molecule.

191. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein said Fc region has an increased proportion of bisected oligosaccharides.

192. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein said modified oligosaccharides are bisected complex.

193. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein said modified oligosaccharides have an increased proportion of bisected, nonfucosylated oligosaccharides in the Fc region of said antigen binding molecule.

194. An antigen binding molecule according to claim 193, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are hybrid.

195. An antigen binding molecule according to claim 193, wherein said bisected, nonfucosylated oligosaccharides are complex.

196. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 20% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

197. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 30% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

198. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 35% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

199. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region of said polypeptide are bisected, nonfucosylated.

200. A method of producing an antigen binding molecule, which is capable of competing with the murine B-Ly1 antibody for binding to human CD20, and wherein said antigen binding molecule is chimeric; said method comprising

a) culturing the host cell of claim 173 or claim 174 in a medium under conditions allowing the expression of said polynucleotide encoding said antigen binding molecule; and

b) recovering said antigen binding molecule.

201. The method of claim 200, wherein said antigen binding molecule is an antibody.

202. The method of claim 200, wherein said chimeric antigen binding molecule is humanized.

203. A pharmaceutical composition comprising the antigen binding molecule according to any of claims 189-199 and a pharmaceutically acceptable carrier.

204. The pharmaceutical composition of claim 203, wherein said composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier.

205. The pharmaceutical composition of claim 203, wherein said composition further comprises an adjuvant.

206. A method of treating a disorder treatable by B-cell depletion comprising administering a therapeutically effective amount of pharmaceutical composition of any of claims 203-205 to a human subject in need thereof.

207. A host cell engineered to express at least one nucleic acid encoding a polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity in an amount sufficient to modify the oligosaccharides in the Fc region of a polypeptide produced by said host cell, wherein said polypeptide is an antigen binding molecule according to any of claims 180-197.

208. The host cell of claim 207, wherein said polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity is a fusion polypeptide.

209. The host cell of claim 207, wherein said antigen binding molecule is an antibody.

210. The host cell of claim 207, wherein said antigen binding molecule is an antibody fragment.

211. The host cell of claim 207, wherein said antigen binding molecule comprises a region equivalent to the Fc region of a human IgG.

212. The host cell of claim 207, wherein said antigen binding molecule produced by said host cell exhibits increased Fc receptor binding affinity as a result of said modification.

213. The host cell of claim 207, wherein said antigen binding molecule produced by said host cell exhibits increased effector function as a result of said modification.

214. A host cell according to claim 208, wherein said fusion polypeptide comprises the catalytic domain of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III.

215. A host cell according to claim 208, wherein said fusion polypeptide further comprises the Golgi localization domain of a heterologous Golgi resident polypeptide.

216. A host cell according to claim 215, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of mannosidase II.

217. A host cell according to claim 215, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\beta(1,2)$ -N-acetylglucosaminyltransferase I.

218. A host cell according to claim 215, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\beta(1,2)$ -N-acetylglucosaminyltransferase II.

219. A host cell according to claim 215, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of mannosidase I.

220. A host cell according to claim 215, wherein said Golgi localization domain is the localization domain of $\alpha 1$ -6 core fucosyltransferase.

221. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased Fc-mediated cellular cytotoxicity.

222. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased binding to NK cells.

223. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased binding to macrophages.

224. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased binding to polymorphonuclear cells.

225. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased binding to monocytes.

226. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased direct signaling inducing apoptosis.

227. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased dendritic cell maturation.

228. A host cell according to claim 213, wherein said increased effector function is increased T cell priming.

229. A host cell according to claim 212, wherein said Fc receptor is Fc γ activating receptor.

230. A host cell according to claim 212, wherein said Fc receptor is Fc γ RIIIA receptor.

231. A host cell according to claim 207, wherein said host cell is a CHO cell, a BHK cell, a NSO cell, a SP2/0 cell, a YO myeloma cell, a P3X63 mouse myeloma cell, a PER cell, a PER.C6 cell or a hybridoma cell.

232. The host cell of claim 207, further comprising at least one transfected polynucleotide encoding a polypeptide according to any of claims 28 and 35-41, and wherein said nucleic acid comprises a sequence encoding a region equivalent to the Fc region of a human immunoglobulin.

233. The host cell of claim 207, wherein said at least one nucleic acid encoding a polypeptide having β (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III activity is operably linked to a constitutive promoter element.

78

234. The host cell of claim 233, wherein said polypeptide having $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III activity is a fusion polypeptide.

235. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 50% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

236. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 60% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

237. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

238. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 80% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

239. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 90% of the oligosaccharides in the Fc region are bisected.

240. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 50% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

241. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 60% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

242. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 70% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

243. An antigen binding molecule according to claim 189, wherein at least 75% of the oligosaccharides in the Fc region are nonfucosylated.

244. A method according to claim 206, wherein said disorder is a B cell lymphoma.

245. An isolated polynucleotide comprising at least one complementarity determining region of the murine B-Ly1 antibody, or a variant or truncated form thereof containing at least the specificity-determining residues for said complementarity determining region, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

246. An isolated polynucleotide according to claim 245, wherein said complementarity determining region is selected from the group consisting of :
[LIST ALL B-Ly1 CDR SEQUENCES].

247. An isolated polynucleotide according to claim 245, wherein said isolated polynucleotide encodes an antigen binding molecule.

248. An isolated polynucleotide comprising at least three complementarity determining regions of the murine B-Ly1 antibody, or variants or truncated forms thereof containing at least the specificity-determining residues for each of said three complementarity determining regions, wherein said isolated polynucleotide encodes a fusion polypeptide.

249. An isolated polynucleotide according to claim 248, wherein said complementarity determining regions comprise at least one sequence selected from the group consisting of : SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7; and at least one sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, and SEQ ID NO:23; and SEQ ID NO:24, or variants or truncated forms of said sequences that contain at least the specificity-determining residues for each of said complementarity determining regions.

250. An isolated polypeptide encoded by the isolated polynucleotides of any of claims 245-249.

251. An antigen binding molecule comprising at least one complementarity determining region of the murine B-Ly1 antibody, or a variant or truncated form thereof containing at least the specificity-determining residues for said

complementarity determining region, and further comprising a sequence derived from a heterologous polypeptide.

252. An antigen binding molecule according to claim 251, wherein said antigen binding molecule comprises at least three complementarity determining regions of the murine B-Ly1 antibody, or variants or truncated forms thereof containing at least the specificity-determining residues for each of said complementarity determining regions.

253. An antigen binding molecule according to claim 252, wherein said antigen binding molecule comprises the variable region of an antibody light or heavy chain.

254. An antigen binding molecule according to claim 252, wherein said antigen binding molecule is a chimeric or humanized, antibody.

255. An engineered Type II anti-CD20 antibody having increased ADCC as a result of said engineering without substantial loss of ability to induce apoptosis of target cells.

256. An engineered Type II anti-CD20 antibody according to claim 255, wherein said antibody has been engineered to have an altered pattern of glycosylation in the Fc region.

257. An engineered Type II anti-CD20 antibody according to claim 256, wherein said altered glycosylation is an increase in the amount of bisected complex oligosaccharides.

258. An engineered Type II anti-CD20 antibody according to claim 256, wherein said altered glycosylation is a decrease in the amount of fucose residues.

259. An engineered Type II anti-CD20 antibody according to claim 255, wherein said antibody has been engineered to have an altered amino acid sequence in the Fc region.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

81

Para:		PCT	
ver forma PCT/ISA/220		OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)	
		Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/220 (segunda página)	
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver el párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No.	Fecha de registro internacional (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)	
PCT/IB2004/003896	05.11.2004	05.11.2003	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/28, A61K39/395			
Solicitante GLYCART BIOTECHNOLOGY AG			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases del Reporte ☐ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220			
Nombre y dirección de correo de ISA: European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario Autorizado Van Klompenburg, W Teléfono No. +31 70 340-2243	

Forma (PCT/ISA/237 (carátula) (Enero de 2004)

84

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma, que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

83

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 3-259

porque:

- ☐ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

- ☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. 3-259 son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

ver hoja separada

- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 3-259

- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

- ☐ no se ha proporcionado
☐ no cumple con el estándar

el formato legible por computador

- ☐ no se ha proporcionado
☐ no cumple con el estándar

- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver la hoja separada para más detalles.

84

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	St: Reivindicaciones 1, 2
	No: Reivindicaciones
Nivel inventivo (IS)	St: Reivindicaciones
	No: Reivindicaciones 1, 2
Aplicabilidad industrial (IA)	St: Reivindicaciones 1-2
	No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

84

Re Item III.

No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

En vista del gran número y también la redacción de las reivindicaciones presentes en el registro, que hacen difícil, si no imposible, determinar la materia para la cual se busca protección, la presente solicitud falla en cumplir con los requerimientos de claridad y concisión del Artículo 6 PCT (ver también Regla 6.1 (a) PCT) en tal medida, que una búsqueda significativa es imposible. En consecuencia, la búsqueda se ha realizado para aquellas partes de la solicitud que si parecen ser claras (y concisas), a saber, la reivindicación 1 y 2 relacionadas con las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y ligera del anticuerpo B-ly1. Se le recuerda al solicitante que las reivindicaciones o partes de las mismas para las cuales no se ha establecido un Reporte de Búsqueda Internacional, no serán sujeto del Examen Preliminar Internacional (Reglas 66 (1) (e); 70 (2) (d) PCT).

Re Item V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 03/011878 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG; BAILEY, SEAN LM) Febrero 13 de 2003 (2003-02-13)
- D2: POLYAK MARIA J ET AL: "Alanina-170 y Prolina-172 son determinantes críticos para epítopes CD20 extracelulares; la heterogeneidad en la especificidad fina de anticuerpos monoclonales CD20 se define por los requerimientos adicionales impuestos por la secuencia de amino ácido y la estructura cuaternaria" BLOOD, W.B. SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 99, No. 9, 1 Mayo 1 de 2002 (2002-05-01), páginas 3256-3262, XP002308044 ISSN: 0006-4971
- D3: DAVIES J ET AL: "Expresión de GnTIII en una línea de célula de producción de CHO anti-CD20 recombinante: La expresión de anticuerpos con glicoformas alteradas conduce a un aumento en ADCC a través de afinidad mayor para FC gamma RIII". BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NUEVA YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, Agosto 20 de 2001 (2001-08-20), páginas 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592.

D4: US 2003/003097 A1 (REFF MITCHELL E ET AL) Enero 2 de 2003 (2003-01-02)

Nivel Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

1 La Reivindicación 1 y 2 se relacionan con secuencias (CDR) de la cadena pesada y ligera del anticuerpo B-ly1 contra CD20 (ejemplo 1 de la presente solicitud). El anticuerpo B-ly1 es bien conocido y está disponible comercialmente, ver por ejemplo, D2, Tabla 1. La diferencia de las reivindicaciones 1, 2 y el técnica previa es la secuencia del ADN que codifica el anticuerpo B-ly1. La ventaja de tener esta secuencia es obvia para una persona experta en la técnica; abre la vía para diseñar genéticamente el anticuerpo. El problema es, por lo tanto, la necesidad de proveer secuencias que codifican anticuerpos CD20. La solución es la provisión de las secuencias de B-ly1. Esta solución no es inventiva (Art. 33(3) PCT), es una simple caracterización del bien conocido anticuerpo B-ly1. El secuenciamiento de anticuerpos monoclonales CD20 también se hizo antes como lo ejemplifica el Rituximab (D1, D-, D3) y no puede, por lo tanto, considerarse que es especialmente difícil ni inesperado.

2 Tampoco se puede considerar que las reivindicaciones 1 y 2 cumplen los requerimientos del Art. 33(3) PCT porque los detalles técnicos suministrados en cada reivindicación no resuelven el problema técnico. Ni las secuencias de la reivindicación 1, ni las secuencias de la reivindicación 2 definen una unidad de enlace funcional. Por lo tanto, constituyen pura información de secuencia sin función.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

87

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/B2004/003896

International filing date (day/month/year)
05.11.2004

Priority date (day/month/year)
05.11.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/28, A61K39/395

Applicant
GLYCART BIOTECHNOLOGY AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:
 - ☒ Box No. I Basis of the opinion
 - ☐ Box No. II Priority
 - ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Box No. VI Certain documents cited
 - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
 - ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application
2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 86.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.
3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA: European Patent Office - P.B. 6818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized Officer van Klompenburg, W Telephone No. +31 70 340-2243
---	--

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2004/003896

88

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

89

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 3-259

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 3-259 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 3-259

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

90

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1,2
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1,2
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1,2
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely claim 1 and 2 relating to CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of the heavy and light chain of the B-ly1 antibody. The applicant is reminded that claims or parts thereof for which no International Search Report has been established, will not be the subject of the International Preliminary Examination (Rules 66 (1) (e); 70 (2) (d) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 03/011878 A (GLYCART BIOTECHNOLOGY AG; BAILEY, SEAN LM) 13 February 2003 (2003-02-13)
- D2: POLYAK MARIA J ET AL: "Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 99, no. 9, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 3256-3262, XP002308044 ISSN: 0006-4971
- D3: DAVIES J ET AL: "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 4, 20 August 2001 (2001-08-20), pages 288-294, XP002285964 ISSN: 0006-3592

92

D4: US 2003/003097 A1 (REFF MITCHELL E ET AL) 2 January 2003 (2003-01-02)

Inventive Step (Art.33(3) PCT)

1 Claim 1 and 2 relate to (CDR) sequences of the heavy and light chain of the B-ly1 antibody against CD20 (example 1 of the present application). The B-ly1 antibody is well known and commercially available, see for instance D2, Table 1. The difference of claims 1,2 and the prior art is the sequence of the DNA encoding the B-ly1 antibody. The advantage of having this sequence is obvious to a person skilled in the art: it opens the way to genetic engineering the antibody. The problem is therefore the need to provide sequences encoding CD20 antibodies. The solution is the provision of the B-ly1 sequences. This solution is not inventive (Art. 33(3) PCT), it is a mere characterization of the well-known B-ly1 antibody. Sequencing CD20 monoclonal antibodies was also done before as exemplified by Rituximab (D1,D3,D4) and can therefore not be considered to be especially difficult nor unexpected.

2 Claims 1 and 2 can also not be considered to fulfill the requirements of Art. 33(3) PCT since the technical details provided in each claim do not solve a technical problem. Neither the sequences of claim 1, nor the sequences of claim 2 do define a functional binding unit. Therefore they constitute pure sequence information without function.

95

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES 93

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

✓
94

**MOLÉCULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE
ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCIÓN EFECTORA**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con moléculas que se enlazan a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales recombinantes, que incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales ABMs, y con los vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La invención se relaciona además con métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos para usar estas ABMs en el tratamiento de enfermedad. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con ABMs con glicosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con enlace al receptor Fc aumentado y función efectora aumentada.

✓

1
95

MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGEN . C . N AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCION EFECTORA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

[0001] La presente invención se relaciona con moléculas que se enlazan antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales recombinantes, que incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales ABMs, y vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La invención se relaciona además con métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos para usar estas ABMs en el tratamiento de enfermedad. En adición, la presente invención se relaciona con ABMs con glicosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas modificadas, incluyendo anticuerpos con enlace al receptor Fc aumentado y función efectora aumentada.

Técnica Previa

El Sistema Inmune y los Anticuerpos Anti-CD20

[0002] El sistema inmune de los vertebrados, incluyendo humanos, consiste de un número de órganos y tipos de células, que han evolucionado para reconocer precisamente y específicamente, enlazar y destruir microorganismos extraños invasores ("antígenos"). Los linfocitos son críticos para la función propia del sistema inmune. Estas células se producen en el timo, el bazo y la médula espinal (adultos) y representan aproximadamente el 30% de los glóbulos blancos totales presentes en el sistema circulatorio de humanos adultos. Hay dos sub-poblaciones importantes de linfocitos: las células T y las células B. Las células T son responsables de la inmunidad mediada por la célula, mientras que las células B son responsables de la producción de anticuerpo (inmunidad humoral). Sin embargo, en una

respuesta inmune, las células T y las células B funcionan interdependientemente: las células T se activan cuando el receptor de célula T se enlaza a fragmentos de un antígeno que está enlazado a glicoproteínas del complejo de histocompatibilidad importantes ("MHC") sobre la superficie de una célula que presenta antígeno; tal activación produce la liberación de mediadores biológicos ("interleucinas"), que estimulan las células B para diferenciar y producir anticuerpos ("inmunoglobulinas") contra el antígeno.

[0003] Cada célula B dentro del huésped expresa un anticuerpo de un tipo y especificidad particular, y diferentes células B expresan anticuerpos específicos para diferentes antígenos. La proliferación de células B y la producción de anticuerpo se disparan como una reacción a un antígeno extraño, y ambas típicamente cesan (o disminuyen sustancialmente) una vez el antígeno extraño ha sido neutralizado. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular continuará inócuo; tal proliferación puede producir un cáncer referido como "linfoma de célula B".

[0004] Las células T y las células B comprenden ambas proteínas de superficie celular que se pueden utilizar como "marcadores" para la diferenciación e identificación. Un marcador de célula B humana es el antígeno Bp35 de diferenciación restringido por linfocito B humano, referido como "CD20". El CD20 se expresa durante el pre-desarrollo temprano de célula B y permanece hasta la diferenciación celular de plasma. Específicamente, la molécula de CD20 puede regular un paso en el proceso de activación que se requiere para la iniciación y diferenciación del ciclo celular y usualmente se expresa en niveles muy altos en las células B neoplásicas ("tumor"). Como CD20 está presente en niveles muy altos de células B "malignas", i.e., aquellas células B cuya proliferación inócuo puede conducir al linfoma de célula B, el antígeno de superficie CD20 tiene el potencial de servir como un candidato para "marcar" linfomas de célula B.

[0005] En esencia, tal marcado se puede generalizar de la siguiente forma: los anticuerpos específicos al antígeno de superficie de CD20 de las células B se introducen en un paciente, mediante inyección, por ejemplo. Estos anticuerpos anti-CD20 se enlazan específicamente al antígeno de superficie celular de CD20 de (ostensiblemente) células B normales y malignas; el anticuerpo anti-CD20 enlazado al antígeno de superficie de

A

97

CD20 puede conducir a la destrucción y depleción de células B neoplásicas. Adicionalmente, se pueden conjugar agentes químicos o etiquetas radiactivas que tienen el potencial de destruir el tumor, con el anticuerpo anti-CD20 de forma que el agente es "entregado" específicamente a e.g., las células B neoplásicas. Sin importar el criterio, un objetivo primario es destruir el tumor: el criterio específico puede ser determinado por el anticuerpo anti-CD20 particular que es utilizado y, así, los criterios disponibles para marcar el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

[0006] Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cancer, como lo demostró la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana, de Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento de célula B positiva de CD20, linfoma de No Hodgkin de grado bajo o folicular, Trastuzumab (Herceptin™, Genentech Inc.) para el tratamiento de cáncer de seno avanzado (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21: 309-18 (1999)), Gemtuzumab (Mylotarg™, Celtech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de leucemia mieloide aguda recurrente, y Alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de célula B. El éxito de estos productos se basa no solamente en su eficacia sino en sus perfiles de seguridad descritos (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M.M., *Clin. Ther.* 21: 309-18(1999)). A pesar de los logros de estos fármacos, actualmente hay un gran interés en obtener mayor actividad de anticuerpo específica que la producida típicamente por la terapia de mAb no conjugada. El anticuerpo monoclonal de murina, B-Ly1, es otro anticuerpo conocido por ser específico al CD20 humano. (Poppema, S. y Visser, L., *Biotech Bulletin* 3: 131-139 (1987)).

[0007] Los resultados de un número de estudios sugieren que los mecanismos dependientes del receptor Fc contribuyen sustancialmente a la acción de anticuerpos citotóxicos contra tumores e indican que un anticuerpo óptimo contra tumores se enlazaría preferencialmente a los receptores Fc de activación y mínimamente al compañero inhibidor FcγRIIB. (Clynes, R. A., et

150

al., *Nature Medicine* 6 (4): 443-446 (2000); Kalergis, A. M., y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195 (12): 1653-1659 (Junio 2002). Por ejemplo, los resultados de al menos un estudio sugieren que el receptor FcγRIIIa en particular está fuertemente asociado con la eficacia de la terapia de anticuerpo. (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3): 754-757 (Febrero 2002)). Ese estudio mostró que los pacientes homocigóticos para FcγRIIIa tienen una mejor respuesta al Rituximab que los pacientes heterocigóticos. Los autores concluyeron que la respuesta superior se debía al mejor enlace in vivo del anticuerpo a FcγRIIIa, lo que produjo una mejor actividad ADCC contra las células de linfoma (Cartron, G., et al., *Blood* 99(3): 754-757 (Febrero 2002)).

[0008] Se han reportado varios intentos para marcar el antígeno de superficie de CD20. Se dice que el anticuerpo 1F5 monoclonal de murina (ratón) (un anticuerpo anti-CD20) fue administrado por infusión intravenosa continua a pacientes con linfoma de células B. Se dice que requirieron niveles extremadamente altos (> 2 gramos) de 1F5 para depletar células de tumores circulantes, y los resultados fueron descritos 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 con este criterio es que los anticuerpos monoclonales no humanos (e.g., anticuerpos monoclonales de murina) típicamente carecen de funcionalidad efectora humana, i.e., no son capaces de, *inter alia*, mediar la lisis dependiente de complemento o lisar células marcadas humanas mediante la toxicidad celular dependiente de anticuerpo o la fagocitosis mediada por el receptor Fc. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína extraña; por lo tanto, repetidas inyecciones de tales anticuerpos extraños puede conducir a la inducción de respuestas inmunes que conducen a reacciones de hipersensibilidad nocivas. Para los anticuerpos monoclonales basados en murina, esto se refiere usualmente como una respuesta de anticuerpo Anti-Ratón humana, o respuesta "HAMA". Adicionalmente, estos anticuerpos "extraños" pueden ser atacados por el sistema inmune del huésped de forma que son, en efecto, neutralizados antes que alcancen su sitio objetivo.

[0009] Otro criterio reportado para mejorar la habilidad de los anticuerpos monoclonales de murina para ser efectivos en el tratamiento de

8
99

los trastornos de célula B ha sido conjugar una etiqueta radioactiva o toxina al anticuerpo de forma que la etiqueta o toxina es localizada en el sitio del tumor. Por ejemplo, el anticuerpo 1F5 referenciado anteriormente ha sido "etiquetado" con yodo-131 (^{131}I) y se dice que se evaluó por 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 que un paciente tratado con IF-5 marcado con ^{131}I logró una "respuesta parcial"); Goldenberg, D. M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B- Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" *Clin. Onc.* 9/4: 548-564 (1991) (tres de los ocho pacientes que recibieron inyecciones múltiples reportaron haber desarrollado una respuesta HAMA); Appelbaum, F. R. "Radiolabeled Monoclonal Anticuerpos 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 anti-CD20 IF5 y B1 marcado con yodo-131); y Kaminski, M. G. et al "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ^{131}I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody". *New England J. Med.* 329/7 (1993) (anticuerpo anti-CD20 B1 marcado con yodo-131; de aquí en adelante "Kaminski"). Las toxinas (i.e., agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina o mitomicina C) también han sido conjugadas a los anticuerpos. Ver, por ejemplo, la solicitud PCT publicada WO 92/07466 (publicada en Mayo 14 de 1992).

[0010] Los anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de anticuerpos de dos o más especies diferentes (e.g., de ratón y humana) han sido desarrollados como una alternativa a 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), describe un anticuerpo quimérico de ratón/humano dirigido contra el antígeno de CD20. Ver también, la publicación PCT No. WO 88/04936. Por ejemplo, el rituximab (RITUXAN®), un anticuerpo anti-CD20 quimérico ha sido aprobado para el tratamiento de linfoma de no Hodking.

✓

100

[0011] Dada la expresión de CD 20 por los linfomas de célula B, este antígeno puede servir como un candidato para "marcar" tales linfomas. En esencia, tal marcado puede generalizarse de la siguiente forma: los anticuerpos específicos para el antígeno de superficie de CD20 sobre células B es administrado a un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se enlazan específicamente al antígeno de CD 20 de (ostensiblemente) células B normales y malignas, y el anticuerpo enlazado al CD20 sobre la superficie celular produce la destrucción y depleción de células B tumorigénica. Adicionalmente, los agentes químicos, citotoxinas o agentes radiactivos pueden ser unidos directamente o indirectamente al anticuerpo anti-CD20 de forma que el agente es "entregado" selectivamente al antígeno de CD 20 que expresa células B. Con ambos criterios, el objetivo primario es destruir el tumor. El criterio específico dependerá del anticuerpo anti-CD20 particular que se utiliza. Así, es obvio que los diferentes criterios para el marcado del antígeno de CD20 pueden variar considerablemente,

[0012] El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un dominio constante de murina quimérica humana gama 1 diseñado genéticamente que contiene anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes humanos gama 1 y es identificado con el nombre de "C2B8" en la Pat. U.S. No. 5,736,137 (Andersen et. al.) emitida el 17 de Abril de 1998, asignada a IDEC Pharmaceuticals Corporation. El RITUXAN® está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma de no Hodgkin de célula B recurrente o refractiva de grado bajo o folicular, positivo a CD20. Los estudios de mecanismo de acción in vitro han mostrado que el RITUXAN® exhibe citotoxicidad humana dependiente del complemento (CDC)(Reff et. al, *Blood* 83 (2): 435-445 (1994)). Adicionalmente, exhibe actividad significativa en los ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El RITUXAN® ha mostrado poseer actividad anti-proliferativa en ensayos de incorporación de timidina y una habilidad limitada para inducir apoptosis directamente, mientras que los anticuerpos de CD20 no (Maloney et al., *Blood* 88 (10): 637a (1996)).

Glicosilación de anticuerpo

[0013] El componente oligosacárido puede afectar significativamente las propiedades relevantes a la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, resistencia al ataque de proteasa, interacciones con el sistema inmune, farmacocinética, y actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no solamente de la presencia o ausencia, sino de las estructuras específicas de oligosacáridos. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y función de glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacárido median la depuración rápida de la glicoproteína desde la corriente sanguínea a través de las interacciones con proteínas de enlace a carbohidrato específico, mientras que otras pueden enlazarse mediante anticuerpos y disparar reacciones inmunes no deseadas. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

[0014] Las células mamíferas son los huéspedes preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glicosilar proteínas en la forma más compatible para aplicación humana. (Cumming et al., *Glycobiology* 1: 115-30 (1991); Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)). Las bacterias muy rara vez glicosilan proteínas, y como otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y planta, producen patrones de glicosilación asociados con depuración rápida desde la corriente sanguínea, interacciones inmunes indeseadas, y en algunos casos específicos, actividad biológica reducida. Entre las células mamíferas, las células de ovario de hamster Chino (CHO) han sido las más comúnmente usadas durante las dos últimas décadas. Además de dar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas de células clonales altamente productivas y genéticamente estables. Pueden ser cultivadas a altas densidades en biorreactores sencillos usando medio libre de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente usadas incluyen células de riñón de hámster (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. Más recientemente, la producción de animales transgénicos también ha sido ensayada. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

[0015] Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en regiones constantes de cadena pesada, teniendo cada isotipo una distribución distinta de estructuras de carbohidrato enlazadas a N, que afectan variablemente en ensamble de proteína, la secreción o la actividad funcional. (Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato enlazado a N varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos altos en manosa, ramificados múltiplemente así como de complejo de biantena. (Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997)). Típicamente, hay procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacárido de núcleo unidas en un sitio de glicosilación particular de forma que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glicoformos múltiples. Asimismo, se ha mostrado que las diferencias importantes en la glicosilación del anticuerpo ocurren entre las líneas de célula, e incluso se ven diferencias menores para una línea de célula dada cultivada bajo condiciones de cultivo diferentes. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5 (8): 813-22 (1995)).

[0016] Una forma de obtener grandes aumentos en la potencia, mientras se mantiene un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios significativos no deseados, es mejorar las funciones efectoras naturales mediadas por célula efectora de los anticuerpos monoclonales diseñando su componente oligosacárido como se describe en Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999) y la Pat. U.S. No. 6,602,684, cuyos contenidos completos están incorporados aquí para referencia. Los anticuerpos del tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia de cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación enlazado a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos de biantena complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, que forman contactos extensos con la estructura del polipéptido, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jeffers, R., et al., *Immunol Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997)).

[0017] Los inventores presentes mostraron anteriormente que la sobreexpresión en células (CHO) de ovario de hámster Chino de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glycosyltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, aumenta significativamente la actividad ADCC in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producida por las células CHO diseñadas. (Ver Umasa, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999); y Publicación Internacional No. WO 99/54342, cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAbs no conjugadas que tienen alta afinidad y especificidad de tumor, pero muy poca potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas de células industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umasa, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Ese estudio fue el primero en mostrar que se podrían obtener grandes aumentos de la actividad de ADCC diseñando células que producen anticuerpo para expresar to GnTIII, que también conduce a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisecados, asociados con (Fc) de región constante, incluyendo oligosacáridos bisecados, no fucosilados, por encima de los niveles encontrados en los anticuerpos que se encuentran naturalmente.

[0018] Permanece una necesidad de criterios terapéuticos mejorados que marcan el antígeno de CD20 para el tratamiento de linfomas de célula B en primates, incluyendo, pero sin limitarse a humanos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] Reconociendo el tremendo potencial terapéutico de las moléculas que se enlazan a antígeno (ABMs) que tienen la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina y que han sido glicodiseñados para mejorar la afinidad de enlace al receptor Fc y función efectora, los presentes inventores desarrollaron un método para producir tales ABMs. *Inter alia*, este método involucra producir anticuerpos recombinantes, quiméricos o

fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estas ABMs se mejora además diseñando el perfil de glicosilación de la región Fc del anticuerpo.

[0020] En consecuencia, en un aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO. : 7. (CDRs_{VH}-1); (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO. : 21, SEQ ID NO. : 22 y SEQ ID NO. : 23. (CDRs_{Vu}-2); y SEQ ID NO: 24. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10. (CDRs_{VL}). En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

[0021] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 3 En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 4. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 47; SEQ ID No: 49; SEQ ID No: 51; SEQ ID No: 53; SEQ ID No: 55; SEQ ID No: 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61 ; SEQ ID No: 63; SEQ ID No: 65; SEQ ID No: 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 75. En una realización, tales polinucleótidos codifican los polipéptidos de fusión.

[0022] La invención se dirige además a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida con un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identificación a la SEQ ID NO: 4, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. La invención está además dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45; SEQ ID

No: 47; SEQ ID No: 49; SEQ ID No:51; SEQ ID No: 53; SEQ ID No: 55; SEQ ID No: 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No: 65; SEQ ID No: 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No:71, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 75, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

[0023] La invención se dirige además a un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 11 (cadena pesada total), o a polinucleótidos que tienen 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a la SEQ ID NO: 11. La invención también está dirigida a un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 12 (la cadena ligera total), o a polinucleótidos que tienen 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a SEQ ID NO: 12.

[0024] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón. La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No: 48 ; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48 ;SEQ ID No : 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No: 66; SEQ ID No: 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No : 72; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la región Fc de

anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0025] En ya otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente al ratón. En ya otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 76. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 76; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0026] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VH del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes funcionales de la misma, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VL del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes funcionales de la misma, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0027] La invención se dirige además a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriores, y a una célula huésped que comprende tal vector de expresión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente.

[0028] En un aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que

consiste de: SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y SEQ ID NO. : 17. (CDRs VH-1) ; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO. : 25, SEQ ID NO.: 26 y SEQ ID NO. : 27 (CDRs VH-2); y SEQ ID NO: 28, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO. : 18, SEQ ID NO.: 19 y SEQ ID NO. : 20. (CDRs VL), en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

[0029] La invención también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO.: 1 o una variante de la misma. La invención se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO. : 2 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana. La invención también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No : 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No: 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72, o una variante de la misma. La invención se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO.: 76 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana.

[0030] En otro aspecto la invención está dirigida a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 de murina y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende tal polipéptido. En una realización la molécula que se enlaza a antígenos es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado o primatizado.

[0031] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 13 o una variante de la misma. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 14.

[0032] En otro aspecto, la invención está dirigida a una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 y que es quimérica. En una realización, la ABM es un anticuerpo o un fragmento de la misma. En una realización adicional, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VH que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.:1 ; SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58 ; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62;SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68 ; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VL que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO.: 2 y SEQ ID NO: 76. En una realización adicional la ABM es un anticuerpo recombinante que es primatizado. En ya una realización adicional la ABM es un anticuerpo recombinante que es humanizado. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc humana. En una realización adicional, cualquiera de las ABMs discutidas anteriormente pueden estar conjugadas con una entidad tal como una toxina o un radiomarcador.

[0033] La invención se relaciona además con una ABM de la presente invención, dicha ABM tiene oligosacáridos modificados. En una realización los oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparada con oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En una realización adicional, la ABM tiene una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados o bisecados, oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de dicha molécula. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisecados son híbridos. En una realización adicional, los oligosacáridos fucosilados bisecados son complejos. En una realización, al menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados o bisecados, no fucosilados. En realizaciones más preferidas, al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% o más de los oligosacáridos son no fucosilados o bisecados, no fucosilados.

[0034] La invención se relaciona además con un polinucleótido que codifica cualquiera de las ABMs discutidas anteriormente, y a vectores de expresión y células que comprenden tal polinucleótido.

[0035] La invención se relaciona además con un método para producir una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 y en donde dicha ABM es quimérica; dicho método comprende: (a) cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una ABM de la presente invención en un medio bajo condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha ABM; y (b) recuperar dicha ABM del cultivo resultante.

[0036] En otro aspecto, la invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende la ABM de la invención. Se contempla que la composición farmacéutica pueda además comprender un vehículo, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos.

[0037] En un aspecto adicional, la invención está relacionada con un método para tratar un trastorno tratable por la depleción de célula B. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la ABM de la presente invención a un sujeto humano en necesidad de la misma. En una realización preferida, el trastorno es tratado por la administración de una ABM que es un anticuerpo quimérico, o un fragmento quimérico de un anticuerpo.

[0038] En ya otro aspecto, la invención está relacionada con una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII, en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc producidos por la célula huésped, en donde la ABM es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20, y en donde la ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII, es un polipéptido de fusión. En otra realización, la ABM producida por la célula huésped es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. In a further realización, la ABM comprende una región equivalente a la región Fc de un IgG humano.

[0039] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una variante o truncación de la misma, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, tales polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula que se enlaza a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncaciones de las mismas que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena pesada o ligera del anticuerpo quimérico (e.g., humanizado). La invención está dirigida además a los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

[0040] En otra realización, la invención está dirigida a una molécula que combina antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o truncación del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula que enlaza antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncación de las mismas, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de las regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula que se enlaza a antígeno es quimérica, e.g., humanizada, anticuerpo. La invención también está dirigida a métodos para preparar tales moléculas que se enlazan a antígeno, y el uso de las mismas en el tratamiento de trastorno, incluyendo linfomas de célula B.

[0041] La presente invención es la primera instancia conocida en la cual un anticuerpo anti-CD20 tipo II ha sido diseñado para tener funciones efectoras aumentadas tales como ADCC, mientras aún retienen habilidad de apoptosis potente. En consecuencia, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti-CD20 tipo II diseñado, que tiene ADCC aumentada como un resultado de dicho diseño y sin pérdida de la habilidad sustancial para inducir apoptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido diseñados para tener un patrón alterado de glicosilación en la región Fc. En una realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel aumentado de residuos complejos bisecados en la región Fc. En otra realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel reducido de residuos de fucosa en la región Fc. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II anticuerpos tienen diseño de polipéptido sometido. La invención se dirige además a métodos para preparar tales anticuerpos Tipo II diseñados, y a métodos para usar tales anticuerpos en el tratamiento de diferentes trastornos de célula B, incluyendo linfomas de célula B.

[0042] La célula huésped de la presente invención se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, 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 PER. C6 o una célula de híbrido. En una realización, la célula huésped de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VL del anticuerpo B-Ly1 de murina o variantes de la misma y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización, la célula huésped de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VH del anticuerpo B-Ly1 de murina o variantes de las mismas y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

[0043] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una célula huésped que produce una ABM que exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada como un resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de enlace

244

aumentada es a un receptor Fc, particularmente, el receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada aquí se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada; enlace aumentado a células NK; enlace aumentado a macrófagos; enlace aumentado a células polimorfonucleares; enlace aumentado a monocitos; señalización directa aumentada que induce apoptosis; maduración de célula dendrítica aumentada; y copiado de célula T aumentado.

[0044] En una realización adicional, la célula huésped de la presente invención comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII que está operablemente enlazado a un elemento promotor constitutivo.

[0045] En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para producir una ABM en una célula huésped, que comprende: (a) cultivar una célula huésped diseñada para expresar menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de dicha ABM y que permite la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha ABM; y (b) aislar dicha ABM; en donde dicha ABM es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 y en donde dicha ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, que comprende preferiblemente el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste del dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de β(1,2)-N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α-6. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

[0046] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un método para modificar el perfil de glicosilación de una ABM anti-CD20 producida por una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped al menos un ácido nucleico o vector de expresión de la invención. En una realización,

la ABM es un anticuerpo o un fragmento del mismo; que comprende preferiblemente la región Fc de un IgG. Alternativamente, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de un IgG humano.

[0047] En un aspecto, la invención está relacionada con un anticuerpo recombinante, quimérico, o un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 y que tiene fucosilación reducida.

[0048] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para modificar la glicosilación del anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo de la invención usando un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente 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 Golgi se selecciona del grupo que consiste de: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α -6. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

[0049] En una realización, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados en donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparado con oligosacáridos no modificados. De acuerdo con la presente invención, estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o complejos. En otra realización, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo que tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos bisecados no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bisecado no fucosilados son complejos. En una realización adicional, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, que tiene

al menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido que son bisecatos, no fucosilados. En una realización preferida, al menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados no fucosilados. En otra realización preferida, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

[0050] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, que muestra una afinidad aumentada de enlace al receptor Fc y/o función efectora aumentada como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de enlace aumentada es a un receptor de activación de Fc. En una realización adicional, el receptor Fc es el receptor de activación de Fcγ, particularmente, el receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada aquí se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada; enlace aumentado a células NK; enlace aumentado a macrófagos; enlace aumentado a células polimorfonucleares; enlace aumentado a monocitos; señalización directa aumentada que induce apoptosis; maduración de célula dendrítica aumentada; y copiado de célula T aumentado.

[0051] En otro aspecto, la invención está dirigida a un fragmento de anticuerpo recombinante, quimérico, que tiene especificidad de enlace al anticuerpo B-Ly1 de murina y que contiene la región Fc, que está diseñado para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0052] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0053] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y

diseñada para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0054] En un aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo recombinante quimérico, producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión producida por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0055] La invención está dirigida además con un método para el tratamiento de un trastorno tratable mediante la depleción de células, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo recombinante, quimérico o un fragmento del mismo, producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, a un sujeto humano en necesidad del mismo.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0056] FIG 1. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 3) y amino ácido (SEQ ID NO: 1) de la región V_H del B-Ly1 de murina.

[0057] FIG 2. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 4) y amino ácido (SEQ ID NO: 2) de la región V_L del B-Ly1 de murina.

[0058] FIG 3. Enlace de Rituximab (O) y ch-B_Ly1 (Δ) a CD20 sobre células de linfoma B Raji.

[0059] FIG 4. Depleción de célula B por Rituximab® (O) y ch-B_Ly1 (Δ) en sangre entera de las tres clases diferentes del genotipo FcγRIIIa-158V/F: (A) sangre entera de un donador F/F, homocigótico para el receptor de afinidad

inferior; (B) sangre entera de un donador F/V, heterocigótico para el receptor de afinidad; y (C) sangre entera de un donador V/V, homocigótico para el receptor de afinidad superior.

[0060] FIG 5. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 11) y amino ácido (SEQ ID NO: 13) de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.

[0061] FIG 6. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 12) y amino ácido (SEQ ID NO: 14) de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.

[0062] FIG 7. Secuencias de nucleótido y amino ácido de CDRs del anticuerpo B-Ly1 de murina. (A) CDRs predichos para la región V_H. (B) CDRs predichos para la región V_L.

[0063] FIG 8. Perfil MALDI-TOF de un anticuerpo B-Ly1 quimérico glicosilado. (A) Tabla que detalla los porcentajes de picos específicos; (B) Espectro para B-Ly1 quimérico glicosilado; (C) Espectro para el B-Ly1 quimérico glicosilado tratado con Endo-H.

[0064] FIG 9. Enlace de diferentes anticuerpos anti-CD20 humanizados a células B Raji. Las diferencias entre el constructo B-HH2 y los constructos B-HL8 y B-HL11 están localizadas en las regiones de marco 1 y 2 con los tres CDRs idénticos. B-HL8 y B-HL11 tienen sus secuencias FR1 y FR2 derivadas de la clase VH3 humana, mientras que el marco de B-HH2 completo es derivado de VH1 humano. B-HL11 es un derivado de B-HL8 con la mutación simple GluGln, siendo Gln el residuo de amino ácido en el constructo B-HH2. Esto significa que el intercambio Glu Gln no altera la afinidad de enlace o intensidad. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son residuos 14 FR, de los cuales uno o más influenciarán el comportamiento de enlace a antígeno de este anticuerpo.

[0065] FIG 10. Enlace del anticuerpo anti-CD20 BHL4-KV1 humanizado en células objetivo Raji. El constructo B-HL4 se deriva del anticuerpo B-HH2 reemplazando el FR1 de B-HH2 con el de la secuencia VH1_45 de línea germinal humana. Este constructo muestra capacidad de enlace a antígeno disminuida en gran medida, a pesar de tener diferentes

amino ácidos en solamente tres posiciones dentro de FR1. Estos residuos están localizados en las posiciones 2, 14, y 30 de acuerdo con la numeración Kabat. De estos, la posición 30 parece ser la posición más influyente, porque es parte de la definición Chothia de CDR1.

[0066] FIG 11. Comparación del comportamiento de enlace entre B-HH1, B-HH2, B-HH3, y el anticuerpo B-Ly1 parental. Los datos muestran que todas las Abs exhiben un valor EC50 similar, pero el constructo B-HH1 se enlaza con una intensidad/estequiometría inferior que las variantes B-HH2 y B-HH3. B-HH1 puede ser distinguido de B-HH2 y B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición Kabat), así como el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración Kabat). Esto indica que cualquier 28, el CDR1 completo, y/o el CDR2 completo es importante para la interacción del anticuerpo/antígeno.

[0067] FIG 12. La comparación de B-HL1, B-HH1, y el anticuerpo B-Ly1 parental. Los datos mostraron ausencia de cualquier actividad de enlace en el constructo B-HL1, y cerca de la mitad de la intensidad/estequiometría de enlace de B-HH1 comparada con B-Ly1. Ambos B-HL1, así como B-HH1, están diseñados con base en marcos de aceptor derivados de la clase humana VH1. Entre otras diferencias, la posición 71 (numeración Kabat) del constructo B-HL1 es una diferencia notoria, indicando su importancia putativa para el enlace de antígeno.

[0068] FIG 13. Análisis fluorocitométrico de la capacidad del anticuerpo anti-CD20 a su antígeno. Los datos mostraron que los constructos B-HL2 y B-HL3 no muestran actividad de enlace de CD-20.

[0069] FIG 14. Apoptosis de anticuerpos anti-CD20 en células MCL Z-138.

[0070] FIG 15. Apoptosis por anticuerpos anti-CD20. Detalles del ensayo: 5×10^5 células/agujero fueron sembradas en placas de 24 agujeros (5×10^5 células/ml) en medio de cultivo. 10 mg del respectivo Ab, PBS para control negativo o Camptotecina 5mM (CPT) control positivo, se agregaron a los agujeros. Las muestras fueron incubadas o/n (16 h), teñidas con AnnV-FITC y analizadas mediante FACS. El ensayo se realizó en triplicados. (*):

Señal para PBS solo sustraído (PBS solo produjo 8% y 2% AnnV+ para células PR-1 y Z-138 respectivamente). Anticuerpos usados aquí: C2B8 (quimérico, no glicosilado); BHH2-KV1 (humanizado, no glicosilado). Nota: este ensayo no involucra ninguna célula efectora adicional, solo objetivos más anticuerpo o controles.

[0071] FIG 16. Muerte de células objetivo por anticuerpos anti-CD20 con células efectoras inmunes. Detalles del ensayo: depleción de células B en incubación durante la noche de sangre entera normal y análisis para CD19+/CD3+ mediante FACS. ADCC usando PBMCs como efectores, incubación de 4 h, relación efector:objetivo de 25:1, muerte de objetivo medida por retención de calceína con relación a lisis de detergente (100%) y a lisis sin Ab (0%). Anticuerpos usados: C2B8 (forma quimérica, no glicosilada); BHH2-KV1-wt (forma humanizada, no glicosilada de BHH2-KV1); BHH2-KV1-GE (forma humanizada, glicosilada de BHH2-KV1).

[0072] FIG 17. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano B-Ly11 humanizado BHH2-KV1 IgG1 no modificado, no glicosilado.

[0073] FIG 18. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano B-ly1 IgG1 humanizado g1 BHH2-KV1. El glicosilado se hizo mediante la co-expresión en células huésped de genes de anticuerpo y enzimas que codifican gen con actividad catalítica de β -1,4-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III).

[0074] FIG 19. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos de Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano de B-ly1 IgG2 humanizado BHH2-KV1 glicosilado. El glicosilado se hizo mediante la co-expresión en células huésped de genes de anticuerpo y enzima que codifica genes con actividad catalítica de β -1,4-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-111) y que codifica enzima con actividad catalítica Golgi α -manosidasa II.

[0075] FIG 20. Enlace de anticuerpos no glicosilados y glicosilados al receptor FcγR1 humano mostrado en la superficie de células CHO-CD16 recombinantes.

[0076] FIG 21. Apoptosis de anticuerpos anti-CD20 de Fc no diseñada o Fc diseñada sobre células MCL Z-138. Detalles del ensayo: 5 x 10⁵ cells/agujero fueron sembradas en placas de 24 agujeros (5 x10⁵ cells/ml) en medio del cultivo. 10 mg del Ab respectivo, PBS para el control negativo se agregaron a los agujeros. Las muestras fueron incubadas o/n (16 h), teñidas con AnnV-FITC y analizadas mediante FACS. En ensayo se hizo en triplicados. Abs usado: C2B8 = rituximab (forma quimérica, no glicosilada, igual que la forma comercial); BHH2-KV1 (humanizado, no diseñado – ver Figura 6 para el perfil de glicosilación); BHH2-KV1 g1 (humanizado, glicosilado – ver Fig. 7 para el perfil de glicosilación); BHH2-KV1 g2 (humanizado, glicosilado – ver Fig 8 para el perfil de glicosilación). Nota: Este ensayo no involucra ninguna célula efectora adicional, solo objetivos más anticuerpo o controles. (*): Señal para PBS solo sustraído.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0077] Los términos usados son los generalmente usados la técnica, a menos que se definan de otra forma.

[0078] Como se usa aquí, el término *anticuerpo* pretende incluir moléculas de anticuerpo enteras, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (e.g., bispecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que tienen la Región Fc y retienen especificidad de enlace, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y que retienen especificidad de enlace. También se abarcan anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos.

[0079] Como se usa aquí, el término *Región Fc* se refiere a la región terminal C 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 humano está definida para estirarse desde el residuo de amino ácido en la posición Cys226 al terminal carboxilo.

[0080] Como se usa aquí, el término *región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina* pretende incluir variantes alélicas de la Región Fc que se encuentran naturalmente de una inmunoglobulina así como variantes que alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la habilidad de la inmunoglobulina para mediar las funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Por ejemplo, uno o más amino ácidos pueden ser borrados del terminal N o el terminal C de la Región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Tales variantes se pueden seleccionar de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica con el fin de tener el efecto mínimo sobre la actividad. (Ver, e.g., Bowie, J. U. et al., *Science* 247: 1306-10 (1990).

[0081] Como se usa aquí, el término *molécula que se enlaza a antígeno* se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se enlaza específicamente a un determinante antigénico. Más específicamente, *una molécula que se enlaza a CD20* es una molécula que se enlaza específicamente a una fosfoproteína no glicosilada de superficie celular de 35,000 Daltons, típicamente designada como antígeno Bp35 de diferenciación restringida de linfocito B humano, referida comúnmente como CD20. "Se enlaza específicamente" significa que el enlace es selectivo para el antígeno y puede ser discriminado de interacciones no deseadas o no específicas.

[0082] Como se usa aquí, los términos *fusión* y *quimérico*, cuando se usan en referencia a polipéptidos tales como ABMs se refiere a polipéptidos que comprenden secuencias de amino ácido derivadas de dos o más polipéptidos heterólogos, tales como porciones de anticuerpos de especies diferentes. Para ABMs quiméricas, por ejemplo, los componentes de enlace a no antígeno se pueden derivar de una amplia variedad de especies, incluyendo primates tales como chimpancés y humanos. La región constante de la ABM quimérica es lo más preferiblemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico es lo más preferiblemente sustancialmente idéntica a la

de un anticuerpo antiCD-20 recombinante que tiene la secuencia de amino ácido de la región variable de B-Ly1 de murina. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferida de anticuerpo de fusión o quimérico.

[0083] Como se usa aquí, un polipéptido que tiene "actividad GnTIII" se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la unión β -1-4 a la manosa enlazada por β del núcleo de trimanosil de oligosacáridos enlazados por N. Esto incluye polipéptidos de fusión que muestran actividad enzimática similar a, pero no necesariamente idéntica a una actividad de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), medido en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia a la dosis. En el caso en que existe dependencia a la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, pero que es sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad dada comparada con la GnTIII (i. e., el polipéptido candidato exhibirá mayor actividad o no más de 25 veces menos y, preferiblemente, no más de aproximadamente 10 veces menos actividad, y más preferiblemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad con relación a la GnTIII.)

[0084] Como se usa aquí, el término *variante* (o análogo) se refiere a un polipéptido que difiera de un polipéptido citado específicamente de la invención por inserciones, eliminaciones y sustituciones de amino ácido creadas usando, e.g., técnicas de ADN recombinante. Las variantes de las ABMs de la presente invención incluyen moléculas que se enlazan a antígeno quiméricas, primatizadas o humanizadas en donde uno o varios de los residuos de amino ácido están modificados por sustitución, adición y/o eliminación de forma que no afectan sustancialmente la afinidad de enlace a antígeno (e. g., CD20). Guía para determinar que residuos de amino ácido pueden ser reemplazados, adicionados o eliminados sin abolir las actividades de interés, se puede encontrar comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de secuencia de amino ácido hechos en las regiones de alta

homología (regiones conservadas) o reemplazando amino ácidos con secuencia de consenso.

[0085] Alternativamente, las variantes de recombinante que codifican estos polipéptidos iguales o similares se pueden sintetizar o seleccionar haciendo uso de la "redundancia" en el código genético. Se pueden introducir varias sustituciones de codón, tales como los cambios silenciosos que producen varios sitios de restricción, para optimizar la clonación en un vector de plásmido o viral o la expresión en un sistema procariontico o eucariótico particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótido se pueden reflejar en el polipéptido o dominios de otros péptidos adicionados al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como afinidades de enlace a ligando, afinidades intercadena, o velocidad de degradación/recambio.

[0086] Preferiblemente, las "sustituciones" de amino ácido son el resultado de reemplazar un amino ácido con otro amino ácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, i.e., reemplazos de amino ácido conservadores. Las sustituciones de amino ácido "conservadoras" se pueden hacer con base en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, amino ácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofan, y metionina; amino ácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirocina, asparagina, y glutamina; amino ácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y amino ácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las "inserciones" o "eliminaciones" están preferiblemente en el rango de aproximadamente 1 a 20 amino ácidos, más preferiblemente 1 a 10 amino ácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente haciendo inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos sistemáticamente en una molécula de polipéptido usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes resultantes para actividad.

[0087] Como se usa aquí, el término *humanizado* se usa para referirse a una molécula que se enlaza a antígeno derivada de una molécula que se

enlaza a antígeno no humana, por ejemplo, un anticuerpo de murina, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de enlace a antígeno de la molécula base pero que es menos inmunogénica en humanos. Esto puede lograrse por varios métodos que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos enteros en las regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar solo los CDRs no humanos en marco humano y regiones constantes con o sin retención de residuos de marco críticos (e.g., aquellos que son importantes para retener buena afinidad de enlace a antígeno o funciones de anticuerpo), o (c) trasplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "encubriéndolos" con una sección tipo humana mediante el reemplazo de residuos de superficie. Tales métodos están revelados en Jones et al., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44: 65-92(1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31 (3): 169-217 (1994), todos los cuales están incorporados aquí para referencia en su totalidad. Generalmente hay 3 regiones determinantes de complementariedad, o CDRs, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, que están flanqueados por cuatro subregiones de marco (i.e., FR1, FR2, FR3, y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Una discusión de anticuerpos humanizados se puede encontrar, *inter alia*, en la Patente U.S. No. 6,632,927, y en la Solicitud publicada U.S. No. 2003/0175269, ambas incorporadas aquí para referencia en su totalidad.

[0088] Igualmente, como se usa aquí, el término *primitizado* se usa para referirse a una molécula que se enlaza a antígeno derivada de una molécula que se enlaza a antígeno de no primate, por ejemplo, un anticuerpo de murina, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de enlace a antígeno de la molécula base, pero que es menos inmuno'genica en primates.

[0089] En el caso en que hay dos o más definiciones de un término que se usa y/o es aceptado en la técnica, la definición del término como se usa aquí pretende incluir todos aquellos significados a menos que se declare específicamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término

"región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígeno no continuos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., Dep. U.S. de Salud y Servicios Humanos, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), que están incorporadas aquí para referencia, en donde las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de amino ácidos cuando son comparados entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de los mismos pretende estar dentro del alcance del término como de ha definido y usado aquí. Los residuos de amino ácido apropiados que abarcan las CDRs definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente están establecidas en la Tabla 1 como una comparación. Los números de residuo exactos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden rutinariamente determinar que residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de amino ácido de región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia	AbM
V_H CDR1	31-35	26-32	26-35
V_H CDR2	50-65	52-58	50-58
V_H CDR3	95-102	95-102	95-102
V_L CDR1	24-34	26-32	
V_L CDR2	50-56	50-52	
V_L CDR3	89-97	91-96	

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas por Kabat et al. (ver más adelante)

[0090] Kabat et al. también definió un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Aquel de conocimiento común en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración Kabat" a cualquier secuencia de dominio

variable, sin basarse en cualquier dato experimental más allá de la secuencia misma. Como se usa aquí, "numeración Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido en Kabat et al., Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, "Secuencia de proteínas de interés inmunológico" (1983). A menos que se especifique de otra forma, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de amino ácido específicos en una ABM están de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (i.e., SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 78) no están enumerada de acuerdo al sistema de enumeración Kabat.

[0091] Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido al menos, por ejemplo 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótido de referencia de la presente invención, se pretende que la secuencia de nucleótido del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones de punto por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótido. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótido de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden ser insertados en la secuencia de referencia. La secuencia de pregunta puede ser la secuencia entera mostrada en cualquier figura de FIG. 24 o FIG. 25.

[0092] Como una materia práctica, si una molécula de ácido nucleico particular o polipéptido es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótido o secuencia de polipéptido de la presente invención puede determinarse convencionalmente usando programas de computadora conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también referido como un alineamiento de secuencia global, se puede determinar usando el programa de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). En una alineación de secuencia las secuencias de pregunta y sujeto son ambas secuencias de

AND. Una secuencia de RNA puede ser comparada convirtiendo las U's a T's. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalidad de no coincidencia = 1, Penalidad de Unión =30, Longitud del grupo de aleatorización =0, Puntaje de corte = 1, Penalidad de brecha = 5, Penalidad de Tamaño de brecha 0.05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótido sujeto, la que sea más corta.

[0093] Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de pregunta por las eliminaciones 5' o 3', no por eliminaciones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto es porque el programa FASTDB nmo cuenta par alas truncaciones 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para las secuencias sujetos truncadas en los extremos 5' o 3', con relación a la secuencia de pregunta, el porcentaje de identidad es corregido calculando el número de bases de la secuencia de pregunta que son 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de pregunta. Si un nucleótido coincide/está alineado se determina mediante los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje es entonces sustraído del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un puntaje de porcentaje de identidad final. Este puntaje corregido es el que se usa para los propósitos de la presente invención. Solamente las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, como se muestran en la alineación FASTDB, que no coinciden/están alineadas con la secuencia de pregunta, son calculadas para los propósitos de ajustar manualmente el puntaje de porcentaje de identidad.

[0094] Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases es alineada a una secuencia de pregunta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones ocurren en el extremo 5' de la secuencia sujeto y por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' que no coinciden/número total de bases en la secuencia de pregunta) de

forma que el 10% es sustraído del puntaje de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases es comparada con una secuencia de pregunta de 100 bases. Esta vez las eliminaciones son eliminaciones internas de forma que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia sujeto que no coinciden/están alineadas con la de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, solamente las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que no coinciden/están alineadas con la secuencia query se corrigen manualmente corregidas. No se hace ninguna otra corrección manual para los propósitos de la presente invención.

[0095] Por un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de amino ácido de pregunta de la presente invención, se pretende que la secuencia de amino ácido del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia de pregunta excepto que la secuencia de polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de amino ácido por cada 100 amino ácidos de la secuencia de amino ácido de pregunta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de amino ácido al menos 95% idéntica a una secuencia de amino ácido de pregunta, hasta 5% de los residuos de amino ácido en la secuencia sujeto puede ser insertada, eliminada, o sustituida con otro amino ácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal amino o carboxi de la secuencia de amino ácido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

[0096] Como una material práctica, si cualquier polipéptido particular es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de referencia, se puede determinar convencionalmente usando programas de computadora conocidos. Un método preferido para determinar la mayor coincidencia entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también referido como una alineación de secuencia global, se puede determinar usando el programa

de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). En una alineación de secuencia, las secuencias de pregunta y sujeto son ambas secuencias de nucleótido o ambas secuencias de amino ácido. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de amino ácido son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalidad de no coincidencia = 1, Penalidad de Unión = 20, Longitud de Grupo de aleatorización =0, Puntaje de corte = 1, Tamaño de ventana = longitud de secuencia, Penalidad de brecha = 5, Penalidad de tamaño de brecha = 0.05, Tamaño de Ventana =500 o la longitud de la secuencia de amino ácido sujeto, la que sea más corta.

[0097] Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de pregunta debido a las eliminaciones del terminal N- o C-, no debidas a eliminaciones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta las truncaciones de terminal de N- y C- de la secuencia sujeto cuando se calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en los terminales N- y C-, con relación a la secuencia de pregunta, el porcentaje de identidad es corregido calculando el número de residuos de la secuencia de pregunta que son terminal N- y C- de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineadas con un residuo sujeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de pregunta. Si un residuo coincide/está alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje es entonces sustraído del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un puntaje de porcentaje de identidad final. Este puntaje de porcentaje de identidad final es el que se usa para los propósitos de la presente invención. Solamente los residuos en los terminales N- C- de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineados con la secuencia de pregunta, son consideradas para los propósitos de ajustar manualmente el puntaje de porcentaje de identidad. Esto es, solamente las posiciones de residuo de pregunta fuera de los residuos más lejanos de los terminales N- y C-de la secuencia sujeto.

[0098] Por ejemplo, una secuencia sujeto de residuo de amino ácido 90 está alineada con una secuencia de pregunta de residuo 100 para

determinar el porcentaje de identidad. La eliminación ocurre en el terminal N- de la secuencia sujeto y por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de los primeros 10 residuos en el terminal N-. Los 10 residuos no emparejados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los terminales N- y C- no emparejados/número total de residuos en la secuencia de pregunta) de forma que 10% es sustraído del puntaje de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieron perfectamente, el porcentaje de identidad final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos es comparada con una secuencia de pregunta de 100 residuos. Esta vez las eliminaciones son eliminaciones internas de forma que no hay residuos en los terminales N- o C- de la secuencia sujeto con no coinciden/están alineados con la de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente las posiciones de residuo fuera de los extremos de terminales N- y C- de la secuencia sujeto, como se muestra en la alineación FASTDB, que no coinciden/están alineados con la secuencia de pregunta se corrigen manualmente. No se hace ninguna otra corrección manual para los propósitos de la invención.

[0099] Como se usa aquí, un ácido nucleico que "se hibridiza bajo condiciones severas" a una secuencia de ácido nucleico de la invención, se refiere a un polinucleótido que se hibridiza en una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende 50% de formamida, 5xSSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextran, y 20ug/ml de ADN de espermatozoos de salmón cortado, desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 0.1x SSC a aproximadamente 65 °C.

[0100] Como se usa aquí, el término *dominio de localización Golgi* se refiere a la secuencia de aminoácido de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclar el polipéptido en la ubicación dentro del complejo Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden "colas" terminales de amino de una enzima.

[0101] Como se usa aquí, el término *función efectora* se refiere a aquellas actividades biológicas que son atribuibles a la Región Fc (una

Región Fc se secuencia nativa o una Región Fc variante de secuencia de amino ácido) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, afinidad de enlace de receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocina, captación de antígeno mediada por el complejo inmune por células que presentan antígeno, regulación descendente de receptores de superficie celular, etc.

[D102] Como se usa aquí, el término diseñar, diseñado, que diseña y diseño de glicosilación se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido que se encuentra naturalmente o recombinante o fragmento del mismo. El diseño de glicosilación incluye diseño metabólico de la maquinaria de glicosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacárido para alcanzar glicosilación alterada de glicoproteínas expresadas en células. Adicionalmente, el diseño de glicosilación incluye los efectos de las mutaciones y el ambiente celular a la glicosilación.

[D103] Como se usa aquí, el término *célula huésped* cubre cualquier caso de sistema celular que puede ser diseñada para generar los polipéptidos y las moléculas que se enlazan a antígeno de la presente invención. En una realización, la célula huésped es diseñada para permitir la producción de una molécula que se enlaza a antígeno con glicoformas modificadas. En una realización preferida, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión. En ciertas realizaciones, las células huésped han sido manipuladas adicionalmente para expresar niveles aumentados de uno o más polipéptidos que tienen actividad GnTIII. Las células huésped incluyen células cultivadas, e.g., células cultivadas mamíferas, tales como células CHO, células BHK, células NSO, 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 de planta, por nombrar solamente unas pocas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido de animal.

[0104] Como se usa aquí, el término *citotoxicidad celular mediada por Fc* incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión de Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmune que conduce a la lisis de "células marcadas por anticuerpo" por "células efectoras inmunes humanas", en donde:

[0105] Las *células efectoras inmunes humanas* son una población de leucocitos que muestran receptores Fc sobre su superficie a través de la cual se enlazan a la región Fc de anticuerpos o de proteínas de fusión de Fc y realizan funciones efectoras. Tal población puede incluir, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

[0106] Las *células marcadas por anticuerpo* son células enlazadas por los anticuerpos o proteínas de fusión Fc. Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc se enlazan a células objetivo mediante el terminal N- de la parte de proteína a la Región Fc.

[0107] Como se usa aquí, el término *citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada* se define como ya sea un aumento del número de "células marcadas por anticuerpo" que son lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo, o de proteína de fusión Fc, en el medio que circunda las células marcadas, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc definido anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo, o de proteína de fusión Fc, en el medio que circunda las células objetivo, requerido para alcanzar la lisis de un número dado de "células marcadas por anticuerpo", en un tiempo dado, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc. El aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es relativo a la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo, o proteína de fusión Fc, producida por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no han sido producidos por células huésped diseñadas para expresar la glicosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos aquí.

[0108] **Anticuerpo que tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCC)** se refiere a un anticuerpo, como el término definido aquí, que tiene ADCC aumentada determinada por cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC in vitro aceptado es el siguiente:

- 1) El ensayo usa células objetivo que son conocidas por expresar el antígeno objetivo reconocido por la región que se enlaza a antígeno del anticuerpo;
- 2) el ensayo usa células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), aisladas de sangre de un donador saludable escogido aleatoriamente, como células efectoras;
- 3) el ensayo se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo:
 - i) las PBMCs son aisladas usando procedimientos de centrifugación de densidad estándar y son suspendidas a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo de célula RPMI;
 - ii) las células objetivo son cultivadas mediante métodos de cultivo de tejido estándares, recolectadas de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor de 90%, lavadas en medio de cultivo de célula RPMI, marcadas con 100 micro-Curies de ^{51}Cr , lavadas dos veces con medio de cultivo de célula, y resuspendidas en medio de cultivo de célula a una densidad de 10^5 células/ml;
 - iii) 100 microlitros de la suspensión de célula objetivo final anterior, son transferidos a cada agujero de una placa microtituladora de 96-agujeros;
 - iv) el anticuerpo se diluye serialmente de 4000 ng/ml a 0.04 ng/ml en medio de cultivo de célula y 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultante son agregadas a las células objetivo en la placa microtituladora de 96-agujeros, ensayadas en triplicado varias

concentraciones de anticuerpo que cubren el rango total de concentración anterior;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 agujeros adicionales en la placa que contiene las células objetivo 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 anterior);

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 agujeros adicionales en la placa que contiene las células objetivo marcadas, reciben 50 microlitros de medio de cultivo de célula RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vii) la placa microtituladora de 96 agujeros es entonces centrifugada a 50 x g por 1 minuto e incubada por 1 hora a 4 °C;

viii) 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) se agregan a cada agujero para producir un efector: relación de célula objetivo de of 25:1 y las placas son colocadas en un incubador bajo atmósfera al 5% de CO₂ a 37 °C por 4 horas;

ix) el sobrenadante libre de célula de cada agujero es recolectado y la radiactividad liberada experimentalmente (ER) es cuantificada usando un contador gama;

x) el porcentaje de lisis específica se calcula para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en donde ER es la radiactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es el promedio de radiactividad cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles de MR (ver punto v anterior), y SR es la radiactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles de SR (ver punto vi anterior);

4) "ADCC aumentada" se define como ya sea un aumento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de

anticuerpo probado anteriormente, y/o una reducción de concentración de anticuerpo requerida para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de anticuerpo probado anteriormente. El aumento de ADCC es relativo a la ADCC, medida con el ensayo anterior, mediado por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no han sido producidos por células huésped diseñadas para sobreexpresar GnTIII.

[0109] En un aspecto, la presente invención se relaciona con moléculas que se enlazan a antígeno que tienen la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina, y al descubrimiento que sus funciones efectoras pueden ser mejoradas mediante glicosilación alterada. En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico. En una realización preferida, la invención está dirigida a un anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo, que comprende las CDRs mostradas en la Figura 7. Específicamente, en una realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO.: 7. (CDRs_{V_H1}); y (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22 y SEQ ID NO.: 23. (CDRs_{V_H2}); y SEQ ID NO.: 24. En otra realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10. (CDRs_{V_L}). En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifican un polipéptido de fusión.

[0110] En otra realización, la molécula que se enlaza a antígeno comprende el dominio V_H del anticuerpo B-Ly1 de murina mostrado en la Figura 1, o una variante del mismo; y un polipéptido de no murina. En otra realización preferida, la invención está dirigida a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el dominio V_L del anticuerpo B-Ly1 de murina mostrado en la Figura 2, o una variante del mismo; y un polipéptido de no murina.

[0111] En otro aspecto, la invención está dirigida a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende una o más CDRs truncadas de B-Ly-1.

Tales CDRs truncadas contendrán, como mínimo, los residuos de amino ácido determinantes de especificidad para la CDR dada. Por "residuo determinante de especificidad" se entiende aquellos residuos que están directamente involucrados en la interacción con el antígeno. En general, solo aproximadamente un quinto a un tercio de los residuos en una CDR dada participan en el enlace al antígeno. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden ser identificados mediante, por ejemplo, computación de contactos interatómicos de modelamiento tridimensional y 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), cuyos contenidos están incorporados aquí para referencia en su totalidad.

[0112] En consecuencia, la invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una variante o forma truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, tales polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula que se enlaza a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (e. g., humanizado). La invención se dirige además a los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

[0113] En otra realización, la invención está dirigida a una molécula que combina antígeno, que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprenden una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno comprende tres regiones

determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de las tres regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico, e.g., humanizado. La invención también está dirigida a métodos para preparar tales moléculas que se enlazan a antígeno, y al uso de las mismas en el tratamiento de enfermedad, incluyendo linfomas de célula B.

[0114] Es conocido que varios mecanismos están involucrados en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CD20, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), y la inducción de detención del crecimiento o apoptosis. Por ejemplo, la mayoría de evidencia experimental indica que el rituximab opera mediante mecanismos efectores convencionales medidor por ensayos CDC y ADCC. Igualmente, se ha mostrado que la resistencia de diferentes células de linfoma al rituximab in vivo es una función de su sensibilidad a CDC in vitro. En contraste, el modo de acción in vivo de otro anticuerpo que ha sido aprobado para uso terapéutico, B1, no requiere actividad de célula de complemento ni asesina natural (NK). En su lugar, la eficacia de B1 in vivo se debe a su habilidad para inducir apoptosis potente.

[0115] En general, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 caen en dos categorías distintas basadas en su mecanismo de acción para erradicar las células de linfoma. Los anticuerpos anti-CD20 Tipo I utilizan principalmente complemento para asesinar células objetivo, mientras que los anticuerpos Tipo II operan mediante mecanismos diferentes, principalmente apoptosis. El Rituximab y 1F5 son ejemplos de anticuerpos anti-CD20 Tipo I, mientras que B1 es un ejemplo de un anticuerpo Tipo II. Ver, e.g., Cragg, M. S. y Glennie, M. J., Blood 103 (7): 2738-2743 (Abril 2004); Teeling, J. L. et al., Blood 104 (6): 1793-1800 (Septiembre 2004), cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia.

[0116] La presente invención es la primera instancia conocida en la cual un anticuerpo anti-CD20 Tipo II ha sido diseñado para tener funciones

efectoras aumentadas tales como ADCC, mientras que retiene la habilidad de apoptosis potente. En consecuencia, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado, que tiene ADCC aumentada como resultado de dicho diseño y sin pérdida de habilidad sustancial para inducir apoptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido diseñados para tener un patrón alterado de glicosilación en la Región Fc. En una realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel aumentado de residuos complejos biseados en la Región Fc. En otra realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel reducido de residuos de fucosa en la Región Fc. Ver Pub. De Sol. De Pat. U.S. No. 2004 0093621 a Shitara et al., cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido sometidos a diseño de polipéptido como se enseña en la Pat. U.S. No. 6,737,056 a Presta o Pub. De Sol. De Pat. U.S. No. 2004 0185045 (Macrogenics) o Pub. Sol. Pat. U.S. No. 2004 0132101 (Xencor), cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia. La invención se dirige además a métodos para preparar tales anticuerpos diseñados Tipo II y a los métodos para usar tales anticuerpos en el tratamiento de varios trastornos de célula B, incluyendo linfomas de célula B.

[0117] Los anticuerpos quiméricos de ratón/humano han sido descritos. Ver, por ejemplo, Morrison, S. L. et al., *PNAS* 11: 6851-6854 (Noviembre 1984); Publicación de Patente Europea No. 173494; Boulianne, G. L. et al., *Nature* 312: 642 (Diciembre 1984); Neuberger, M. S. et al., *Nature* 314: 268 (Marzo 1985); Publicación de Patente Europea No. 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135: 8564 (Noviembre 1985); Sun, L. K et al., *Hybridoma* 5 (1): 517 (1986); Sahagen et al., *J. Immunol.* 137: 1066- 1074 (1986). Ver generalmente, Muron, *Nature* 312: 597 (Diciembre 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5 (3) (Marzo 1985); Marx, *Science* 229: 455 (Agosto 1985); y Morrison, *Science* 229: 1202-1207 (Septiembre 1985). Robinson et al., en el Número de Publicación PCT WO/88104936 describe un anticuerpo quimérico con una región constante humana y región variable de murina, que tiene especificidad a un epítopo de CD20; la porción de murina del anticuerpo quimérico de las referencias Robinson se deriva del anticuerpo monoclonal de ratón 2H7 (gama 2b, kapa). Mientras que la referencia nota que el anticuerpo quimérico descrito es un "Candidato de copiado" para el tratamiento de trastornos de célula B, esta declaración

puede ser vista como no más que una sugerencia para los expertos en la técnica para determinar si esta sugerencia es precisa o no para este anticuerpo particular, particularmente porque la referencia carece de cualquier dato para soportar una aserción de efectividad terapéutica, y en forma importante, datos usando mamíferos de orden superior tales como primates o humanos.

[D118] Las metodologías para generar anticuerpos quiméricos están disponibles a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada se pueden expresar separadamente, usando, por ejemplo, cadena ligera de inmunoglobulina y cadenas pesadas de inmunoglobulina en plásmidos separados, o en un solo vector (e.g. , policlónico). Estas pueden ser entonces purificadas y ensambladas in vitro en anticuerpos completos; las metodologías para realizar talensamble han sido descritas. Ver, por ejemplo, Scharff, M., Harvey Lectures 69: 125 (1974). Los parámetros de reacción in vitro para la formación de anticuerpos IgG de cadenas ligera y pesada aisladas reducidas también han sido descritos. Ver, por ejemplo, Sears et al., *Biochem.* 16 (9): 2016-25 (1977).

[D119] En una realización particularmente preferida, la ABM quimérica de la presente invención es un anticuerpo humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las ABMs humanizadas de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos de la Pat. U.S. No. 5,225,539 a Winter, Pat. U.S. No. 6,180,370 a Queen et al., o Pat. U.S. No. 6,632,927 a Adair et al., cuyos contenidos enteros están incorporados aquí para referencia. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de amino ácido introducidos en este de una fuente que no es humana. Estos residuos de amino ácido no humanos son referidos usualmente como residuos "importados", que son tomados típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522- 525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327(1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536(1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariables para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Pat. U.S. No. 4,816, 567) en donde sustancialmente

menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos anti-CD20 humanos sujetos comprenderán regiones constantes de inmunoglobulina humana.

[0120] La elección de dominios variables humanos, ligeros y pesados, a ser usados en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es seleccionada contra la librería entera de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor es entonces aceptada como la región de marco humana (FR) 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 de marco humana es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco de roedor total (i.e., FR1, FR2, FR3, y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (e.g., FR1 y FR2) contra una librería conocida de secuencia de región variable humana que corresponde a esa subregión de marco (e.g., determinada por la numeración Kabat), y escoger la secuencia humana para cada subregión o combinación que es la más cercana a la del roedor (Leung Publicación de Solicitud de Patente No. 2003/0040606^a1, publicada en 27 de Febrero de 2003). Otro método usa una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4285 (1992)); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0121] Es además importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias parental y diferentes productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y

humanizada. Los moldes de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares a los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de esas representaciones permite el análisis de el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, i.e., el análisis de residuos que influencia la habilidad de la inmunoglobulina candidata para enlazarse a su antígeno. De esta forma, los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados a partir de secuencias de recipiente e importadas de forma que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para antígeno(s) marcado(s). En general, los residuos de región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en la influencia de enlace de antígeno.

[0122] En otra realización, las moléculas que se enlazan a antígeno de la presente invención son diseñadas para tener afinidad de enlace mejorada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos revelados en Pub. Sol. Pat. U.S. No. 2004/0132066 a Balint et al., cuyos contenidos enteros están incorporados aquí para referencia.

[0123] En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno de la presente invención está conjugada a una mitad adicional, tal como un radiomarcador o una toxina. Tales ABMs conjugadas se pueden producir mediante métodos numerosos que son bien conocidos en la técnica.

[0124] Una variedad de radionúclidos son aplicables a la la presente invención y los expertos en la técnica están acreditados con la habilidad de determinar fácilmente cual radionúclido es el más apropiado bajo una variedad de circunstancias. Por ejemplo, ¹³¹yodo es un radionúclido usado para inmunoterapia marcada. Sin embargo, la utilidad clínica del ¹³¹yodo puede estar limitada por varios factores que incluyen: vida media física de ocho días; deshalogenación de anticuerpo yodado tanto en la sangre y en los sitios de tumor; y características de emisión (eg, componente gama grande) que puede ser subóptimo para la deposición localizada de dosis en tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad de adherir grupos quelantes metálicos a las proteínas ha aumentado las

oportunidades de utilizar otros radionúclidos tales como $^{111}\text{Indio}$ y $^{90}\text{Itrio}$. El $^{90}\text{Itrio}$ provee varios beneficios para utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la vida media de 64 horas del $^{90}\text{Itrio}$ es lo suficientemente larga para permitir la acumulación de anticuerpo por el tumor y, contrario al, $^{131}\text{Yodo}$, el $^{90}\text{Itrio}$ es un emisor beta puro de alta energía sin irradiación gama acompañante en su decaída, con un rango en tejido de 100 a 1000 diámetros de célula. Adicionalmente, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración a un paciente externo de anticuerpos marcados con $^{90}\text{Itrio}$. Adicionalmente, la internalización de anticuerpo marcado no se requiere para la muerte de células, y la emisión local de radiación de ionización debe ser letal para células de tumor adyacentes que carecen de antígeno marcado.

[0125] Las dosis de tratamiento simple efectivas (i.e., cantidades terapéuticamente efectivas) de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{90}\text{Itrio}$ varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis de ablación diferente de médula de tratamiento simple efectivo de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativa de tratamiento simple efectivo (i.e. puede requerir trasplante de médula espinal autólogo) de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. En conjunción con un anticuerpo anti-CD20 quimérico, que pertenece a anticuerpos de murina vis-à-vis de vida media más larga, las dosis ablativas diferentes de médula de tratamiento simple efectivo de anticuerpos anti-CD20 quiméricos marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de representación para, e.g., la etiqueta de $^{111}\text{Indio}$, son típicamente de menos de aproximadamente 5 mCi.

[0126] Con respecto a los anticuerpos anti-CD20 radiomarcados, también puede ocurrir terapia con estos usando un tratamiento de terapia simple o usando tratamientos múltiples. Debido al componente radionúclido, se prefiere que antes del tratamiento, las células de tallo periféricas ("PSC")

o médula espinal ("BM") sean "recolectadas" para pacientes que experimentan toxicidad de médula espinal de hueso potencialmente fatal producida por la radiación. BM y/o PSC son recolectadas usando técnicas estándar, y luego purgadas y congeladas para posible reinfusión. Adicionalmente, es lo más preferido que antes del tratamiento se conduzca un estudio de dosimetría de diagnóstico usando un anticuerpo marcado de diagnóstico (eg, usando "indio") en el paciente, cuyo propósito es asegurar que el anticuerpo marcado terapéuticamente (e.g, usando ⁹⁰Itrio) no se volverá innecesariamente "concentrado" en ningún órgano o tejido normal.

[0127] En una realización preferida, la presente invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido como se muestra en la Tabla 3 siguiente. La invención se dirige además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótido mostrada en la Tabla 2 siguiente. En otra realización, la invención está dirigida a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que condifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de amino ácido en la Tabla 3. La invención también abarca un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que condifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido de cualquiera de los constructos de la Tabla 3 con sustituciones de amino ácido conservadoras.

TABLA 2

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUCLEOTIDO	SEC ID No
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACGCACAGAAA</u> <u>ITCCAAGGAAGAGTCACAATTACCGCC</u>	29

	<u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCA</u>	
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>GCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>GCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATCTGTGTGCAAGAAATG</u> <u>TCCTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTG</u> <u>GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	33
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGAGCTTCAGTG</u>	35

	<u>AAGGTCTCCTGCAAGGTCTCCGGATAC</u> <u>GCGTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGG</u> <u>GTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCT</u> <u>CGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGG</u> <u>CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAA</u> <u>ATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATG</u> <u>GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC</u> <u>ACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACT</u> <u>GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	
B-HH5	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>GCGTTCAGCTATTCTTGGATGAGCTGG</u> <u>GTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCT</u> <u>CGAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGG</u> <u>CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAA</u> <u>ATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATG</u> <u>GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC</u> <u>ACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACT</u> <u>GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	37
B-HH6	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>GCCTTCAGCTATTCTTGGATCAATTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u>	39

	<u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	
B-HH7	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>GCCTTCAGCTATTCTTGGATCTCGTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCA</u>	41
B-HH8	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGCGCCTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCACATACAGCTGGATGAACTGG</u> <u>GTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCT</u> <u>CGAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGG</u> <u>CGATGGGGATACTGACTACAATGGGAA</u> <u>ATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGC</u> <u>CGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATG</u> <u>GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC</u> <u>ACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACT</u> <u>GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	43
B-HH9	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGCGCCTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGG</u>	45

	<u>TGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	
B-HL1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCACCTATTCTTGGATGCACTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACGCACAGAAA</u> <u>TTCCAAGGAAGAGTCACAATGACACGG</u> <u>GACACGTCCACTTCCACCGTCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCA</u>	47
B-HL2	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGGCCACCGTG</u> <u>AAGATCTCCTGCAAGGTGTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCACCTATTCTTGGATGCACTGGG</u> <u>TGCAGCAGGCCCCCTGGAAAGGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACGCAGAGAAA</u> <u>TTCCAAGGAAGAGTCACAATCACAGCC</u> <u>GACACGTCCACTGACACCGCCTATATG</u> <u>GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC</u> <u>ACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACT</u>	49

	<u>GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	
B-HL3	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGCCTGGGGCCACCGTG</u> <u>AAGATCTCCTGCAAGGTGTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCACCTATTCTTGGATGAACTGGG</u> <u>TGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGAAGAGTCACAATCACAGCC</u> <u>GACACGTCCACTGACACCGCCTATATG</u> <u>GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC</u> <u>ACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACT</u> <u>GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	51
B-HL4	<u>CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCT</u> <u>GAAGTTAAGAAGACCGGGAGTTCAGTG</u> <u>AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCCGGATAC</u> <u>ACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCTGGG</u> <u>TCCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTC</u> <u>GAGTGGATGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACGCACAGAAA</u> <u>TTCCAAGGAAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCAGCTAGCACC</u>	53
B-HL8	<u>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGA</u> <u>GGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTG</u> <u>CGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGG</u> <u>TCCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTC</u> <u>GAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGC</u>	55

	<u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u> <u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCA</u>	
B-HL10	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACT</u> <u>CCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGG</u> <u>TCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTCT</u> <u>GGATTCGCATTGAGCTATTCTTGGATGA</u> <u>ACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTT</u> <u>TCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAAT</u> <u>TACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC</u> <u>AAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC</u> <u>ACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	57
B-HL11	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGA</u> <u>GGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTG</u> <u>CGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGG</u> <u>TGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG</u> <u>GAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGC</u> <u>GATGGGGATACTGACTACAATGGGAAA</u> <u>TTCAAGGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGG</u> <u>AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA</u> <u>CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGT</u>	58

	<u>CTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC</u> <u>TCA</u>	
B-HL12	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCACT</u> <u>CCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGT</u> <u>CCCTGCCGGCTCTCCTGCCGAGCCTCTG</u> <u>GATTCACATTTAGCTATTCTTGGATGAA</u> <u>CTGGGTGCCGGCAGGCTCCTGGAAAGG</u> <u>GCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTC</u> <u>CCGGCGATGGGGATACTGACTACAATG</u> <u>GGAAATTCAGGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG</u> <u>AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA</u> <u>GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGT</u> <u>TTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	61
B-HL13	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCACT</u> <u>CCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTGGAG</u> <u>GAGGCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCC</u> <u>CTGCCGGCTCTCCTGCCGAGCCTCTGGA</u> <u>TTGACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTT</u> <u>TCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAGGGGCAGAGTCACAAT</u> <u>TACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC</u> <u>AAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC</u>	63

	<u>ACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	
B-HL14	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCTCACT</u> <u>CCGAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCCG</u> <u>GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGG</u> <u>TCCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCT</u> <u>GGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGA</u> <u>ACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAG</u> <u>GGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTT</u> <u>CCCGGCGATGGGGATACTGACTACAAT</u> <u>GGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCC</u> <u>TATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT</u> <u>GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCA</u> <u>AGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTG</u> <u>TTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA</u> <u>CCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	65
B-HL15	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACT</u> <u>CCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTT</u> <u>CCCTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTG</u> <u>GATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAA</u> <u>CTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGG</u> <u>GCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTC</u> <u>CCGGCGATGGGGATACTGACTACAATG</u> <u>GGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG</u> <u>AGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAA</u> <u>GAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGT</u> <u>TTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u>	69

	<u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCAC</u> <u>CCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAG</u> <u>GAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCC</u> <u>TGCGGGTCAGCTGCCGAGCCTCTGGAT</u> <u>TCACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTG</u> <u>GGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTT</u> <u>TCCCGGCGATGGGGATACTGACTACAA</u> <u>TGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAAT</u> <u>TACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC</u> <u>TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC</u> <u>AAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC</u> <u>ACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	
B-HL17	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCA</u> <u>TGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCT</u> <u>TGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCAC</u> <u>CCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGG</u> <u>TCCCTGCCGCTCTCCTGCCGAGCCTCT</u> <u>GGATTCACATTTAGCTATTCTTGGATGA</u> <u>ACTGGGTGCCGCAGGCTCCTGGAAAG</u> <u>GGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTT</u> <u>CCCGGCGATGGGGATACTGACTACAAT</u> <u>GGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAAT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCC</u> <u>TATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT</u> <u>GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCA</u> <u>AGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTTG</u> <u>TTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA</u> <u>CCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
Secuencia de señal de V _H	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTC</u> <u>TTGGTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCAC</u> <u>TCC</u>	73

82
152

B-KV1	<u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCT</u> <u>CCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCCG</u> <u>CCAGCATTAGCTGCAGGTCTAGCAAGA</u> <u>GCCTCTTGACAGCAATGGCATCACTTA</u> <u>TTTGATTGGTACCTGCAAAAGCCAGGG</u> <u>CAGTCTCCACAGCTCCTGATTTATCAA</u> <u>TGTCCAACCTTGTCTCTGGCGTCCCTGA</u> <u>CCGGTTCTCCGGATCCGGGTCAGGCAC</u> <u>TGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTG</u> <u>GAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACT</u> <u>GCGCTCAGAATCTAGAACTTCCTTACAC</u> <u>CTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT</u> <u>CAAACGTACGGTG</u>	75
Secuencia de Señal de V _L	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC</u> <u>CTGGGCCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCA</u> <u>GGTGCCAGGTGT</u>	77

TABLA 3

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE AMINOACIDO	SEC ID No
B-HH1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYT</u> <u>FSYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYAKFKQGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWQQ</u> <u>GTILVTVSS</u>	30
B-HH2	<u>OVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPG</u> <u>DGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYQQG</u> <u>TLVTVSS</u>	32
B-HH3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA</u> <u>FSYSVMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPG</u> <u>DGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSEDTAVYLCARNVFDGYWLVYWG</u> <u>QGTILVTVSS</u>	34

83

B-HH4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYA</u> <u>FSYSWMNWRQAPGGGLEWMGRIFPG</u> <u>DGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWG</u> <u>QGTLVTVSS</u>	36
B-HH5	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA</u> <u>FSYSWMSWVRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>	38
B-HH6	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA</u> <u>FSYSWINWRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>	40
B-HH7	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA</u> <u>FSYSWISWVRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>	42
B-HH8	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT</u> <u>FTYSWMNWRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ</u> <u>GTLVTVSS</u>	44
B-HH9	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT</u> <u>FSYSWMNWRQAPGGGLEWMGRIFPG</u> <u>DGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWG</u> <u>QGTLVTVSS</u>	46
B-HL1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT</u> <u>FTYSWMHWVRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYAKKFOGRVTMTRDTSTSTVYMEI</u> <u>SSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWG</u> <u>QGTLVTVSS</u>	48
B-HL2	<u>ELVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYTFTY</u>	50

	<u>SWMHWVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSL</u> <u>RSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGGT</u> <u>LVTVSS</u>	
B-HL3	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF</u> <u>TYSWMNWVQQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADTSTD TAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGO</u> <u>G TLVTVSS</u>	52
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYT</u> <u>FTYSWMSWVRQAPGGGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYAEKFQGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>G TLVTVSS</u>	54
B-HL8	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GT LVTVSS</u>	56
B-HL10	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFA</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTL VTVSS</u>	58
B-HL11	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	60
B-HL12	<u>EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	62
B-HL13	<u>EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u>	64

	<u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	
B-HL14	<u>EVQLVESGGGLKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	66
B-HL15	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	68
B-HL16	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	70
B-HL17	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT</u> <u>FSYSWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGD</u> <u>GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS</u> <u>SLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	72
Secuencia de señal de V _H	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	74
B-KV1	<u>DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLI</u> <u>HSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLYOMSNL</u> <u>VSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV</u> <u>GVYYCAONLELPYTFGGGTKVEIKRTV</u>	76
Secuencia de señal de V _L	<u>MDMRVPAQLGLLLWFPGARC</u>	78

[0128] En otra realización preferida, la presente invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido mostrada en la FIG.1 o FIG. 2. La invención está dirigida además a un ácido nucleico aislado que

comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en la FIG. 5 o FIG. 6. En otra realización, la invención está dirigida a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de amino ácido de la FIG. 5 o FIG. 6. La invención también abarca un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido de cualquiera de la FIG. 1, FIG. 2, FIG. 5 o FIG. 6 con sustituciones de amino ácido conservadoras.

[0129] En otra realización, la presente invención está dirigida a un vector de expresión y/o una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención.

[0130] Generalmente, se puede usar cualquier tipo de línea de célula cultivada para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferida, se usan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER. C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta como la línea de célula patrón para generar las células huésped diseñadas de la invención.

[0131] La eficacia terapéutica de las ABMs de la presente invención se puede mejorar produciéndolas en una célula huésped que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En otra realización preferida, la expresión de las ABMs de la presente invención en una célula huésped que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII produce ABMs con afinidad de enlace a Fc aumentada y función efectora aumentada. En consecuencia, en una realización, la presente invención está dirigida a una célula huésped que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM de la presente invención, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que

se enlaza a CD20 humano. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII, y el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. Los métodos para generar tales polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras aumentadas se revelan en la Sol. De Pat. Provisional U.S. No. 60/495,142, cuyos contenidos totales están expresamente incorporados aquí para referencia. En otra realización preferida, la ABM quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que tiene la especificidad de enlace del anticuerpo B-LY1 de murina. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo quimérico comprende un Fc humano. En otra realización preferida, el anticuerpo es primatizado o humanizado.

[0132] En una realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM de la presente invención se pueden expresar bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, de un sistema de expresión regulado. Sistemas de expresión regulada adecuados incluyen, pero no se limitan a, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecodiona, un sistema de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoide, un sistema promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión inducible por metal de metalotioneína. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una ABM de la presente invención están comprendidos dentro de un sistema de célula huésped, algunos de ellos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros son expresados bajo el control de un promotor regulado. El nivel máximo de expresión se considera ser el más alto posible de expresión de polipéptido estable que no tiene un efecto adverso significativo sobre la velocidad de crecimiento de célula, y será determinado usando experimentación de rutina. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de manchas al Occidente usando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta de péptido fusionada a la ABM; y análisis de manchas al Norte. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede estar operativamente unido a un gen reportero; los niveles de expresión de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina, se determinan mediante la medida de una señal correlacionada con

el nivel de expresión del gen reportero. El gen reportero puede ser transcrito junto con el(los) ácidos nucleico(s) que codifican dicho polipéptido de fusión como una molécula de RNA simple; las secuencias de codificación respectivas pueden estar unidas ya sea mediante un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o mediante un mejorador de traslación independiente de capuchón (CITE). El gen reportero puede ser trasladado junto con al menos un ácido nucleico que codifica una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina de forma que se forma una cadena de polipéptido simple. Los ácidos nucleicos que codifican las AMBs de la presente invención pueden estar operativamente unidos al gen reportero bajo el control de un promotor simple, de forma que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y el gen reportero son transcritos a una molécula de RNA que es alternativamente dividida en dos moléculas de RNA mensajeras (mRNA); una de las mRNAs resultantes es trasladada en dicha proteína reportera, y la otra es trasladada a dicho polipéptido de fusión.

[0133] Se pueden usar los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia de codificación de una ABM que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina junto con señales de control transcripcional/transnacional apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, 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).

[0134] Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión por huésped para expresar la secuencia de codificación de las ABMs de la presente invención. Preferiblemente, las células mamíferas son usadas como sistemas de célula huésped transfectadas con ADN de plásmido recombinante o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen la secuencia de codificación de la proteína de interés y la secuencia de codificación del polipéptido de fusión. Lo más preferido, células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO,

células de mieloma P3X63 de ratón, células PER, células PER. C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta se usan como sistema de célula huésped. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección están descritos en las siguientes referencias, y las referencias de allí: Borth *et al.*, *Biotechnol. Bioen.* 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 alternas, se pueden contemplar sistemas de célula huésped eucariótica, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia de codificación de una ABM de la presente invención; sistemas de célula de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (e. g. , baculovirus) que contienen la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina; sistemas de célula de planta infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (e.g., virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (e.g., plásmido Ti) que contienen la secuencia de codificación de la ABM de la invención; o sistemas de célula animal infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (e.g., adenovirus, virus de vaccinia) que incluyen líneas de células diseñadas para contener múltiples copias de ADN que codifican una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina ya sea amplificado establemente (CHO/dhfr) o aplicado inestablemente en cromosomas dobles diminutos (e.g., líneas de célula de murina). En una realización, el vector que comprende el(los) polinucleótido(s) que codifica(n) la ABM de la invención es policistrónico. También, en una realización la ABM discutida anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

[0135] Para los métodos de esta invención, generalmente se prefiere la expresión estable a la expresión transitoria porque típicamente logra resultados más reproducibles y también es más dócil para producción a gran escala. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes

virales de replicación, las células huésped pueden ser transformadas con los ácidos nucleicos codificadores respectivos controlados por los elementos de control de expresión apropiados (e.g., promotor, mejorador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poladenilación, etc.), y un marcador elegible. Siguiendo a la introducción de AND extraño, las células diseñadas se pueden dejar crecer por 1-2 días en un medio enriquecido, y luego son cambiados a un medio selectivo. El marcador elegible en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que tienen integrado establemente el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas de célula.

[0136] Se puede usar un número de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, la timidina quinasa del virus de herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11: 223 (1977)), genes hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026 (1962)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22: 817 (1980)), que se pueden emplear en células tk-, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia de antimetabolito se puede usar como la base de selección para genes dhfr, que confieren resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3567 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527 (1981)); gpt, que confieren resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo, que confieren resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981)); e hgro, que confieren resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30: 147 (1984). Recientemente, genes elegibles adicionales han sido descritos, a saber trpB, que permite a las células usar indol en lugar de triptofan; hisD, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8047(1988)); el sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

[0137] La presente invención está dirigida además a un método para modificar el perfil de glicosilación de las ABMs de la presente invención que

son producidas por una célula huésped, que comprende la expresión en dicha célula huésped de un ácido nucleico que codifica una ABM de la invención y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII, o un vector que comprende tales ácidos nucleicos. Preferiblemente, el polipéptido modificado es IgG o un fragmento del mismo que comprende la Región Fc. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

[0138] Las ABMs modificadas producidas por las células huésped de la invención exhiben afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la Región Fc. Preferiblemente, la afinidad aumentada de enlace al receptor Fc es enlace aumentado a un receptor que activa Fcγ, tal como el receptor FcγRIIIa receptor. La función efectora aumentada es preferiblemente un aumento en uno o más de las siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación aumentada de antígeno mediada por complejo inmune por células que presentan antígeno, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a células polimorfonucleares (PMNs), enlace aumentado a monocitos, entrecruzamiento aumentado de anticuerpos enlazados a objetivo, señalización directa aumentada que induce apoptosis, maduración de célula dendrítica aumentada, y copiado aumentado de célula T.

[0139] La presente invención también está dirigida a un método para producir una ABM de la presente invención, que tiene oligosacáridos modificados en una célula huésped que comprende (a) cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de una ABM de acuerdo con la presente invención, en donde dicho polipéptido que tiene actividad GnTIII está expresado en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de dicha ABM producida por dicha célula huésped; y (b) aislar dicha ABM. En una

realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi.

[0140] Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. Alternativamente, el dominio de localización Golgi se selecciona del grupo que consiste de: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α 1-6. Las ABMs producidas por los métodos de la presente invención tienen afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada. Preferiblemente, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación de antígeno mediado por complejo inmune aumentada por células que presentan antígeno, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a monocitos, enlace aumentado a células polimorfonucleares, señalización directa aumentada que induce apoptosis, reticulación aumentada de anticuerpos enlazados a objetivo, maduración de célula dendrítica aumentada, o copiado aumentado de célula T. La afinidad de enlace al receptor Fc aumentado es preferiblemente enlace aumentado a los receptores que activan Fc tal como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

[0141] En otra realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina producidos mediante los métodos de la invención que tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados en la Región Fc de dicho polipéptido. Se contempla que tal ABM abarque anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden la Región Fc. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisecados en la Región Fc de la

ABM es al menos 50%, más preferiblemente, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90%, y lo más preferido al menos 90-95% de los oligosacáridos totales. En ya otra realización, la ABM producida mediante los métodos de la invención tiene una proporción aumentada 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 al menos 50%, preferiblemente, al menos 60% a 70%, lo más preferido al menos 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser tipo híbrido o complejo. En una realización particularmente preferida, la ABM producida por las células huésped y los métodos de la invención tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la Región Fc. Los oligosacáridos bisecados, no fucosilados pueden ser híbridos o complejos. Específicamente, los métodos de la presente invención se pueden usar para producir ABMs en las cuales al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de la ABM son bisecados, no fucosilados. Los métodos de la presente invención también se pueden usar para producir polipéptidos en los cuales al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc del polipéptido son bisecados híbridos no fucosilados.

[0142] En otra realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace al anticuerpo B-Ly1 de murina diseñado para tener función efectora aumentada y/o afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, producida mediante los métodos de la invención. Preferiblemente, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación de antígeno mediado por complejo inmune aumentada por células que presentan antígeno, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a monocitos, enlace aumentado a células polimorfonucleares, señalización directa aumentada que induce apoptosis, reticulación

aumentada de anticuerpos enlazados a objetivo, maduración de célula dendrítica aumentada, o copiado aumentado de célula T. En una realización preferida, la afinidad de enlace al receptor Fc aumentada es enlace aumentado a un receptor que activa Fc, el más preferido, FcγRIIIa. En una realización, la ABM 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 preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

[0143] La presente invención está dirigida además a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABMs de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0144] La presente invención está dirigida además al uso de tales composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento del cáncer. Específicamente, la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

[0145] La presente invención provee además métodos para la generación y uso de sistemas de célula huésped para la producción de glicoformas de las ABMs de la presente invención, que tienen afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, preferiblemente enlace aumentado a los receptores que activan Fc, y/o que tienen funciones efectoras aumentadas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La metodología de glicodiseño que se puede usar con las ABMs de la presente invención han sido descritas en gran detalle en la Pat. U.S. No. 6,602,684 y la Solicitud de Patente U.S. Provisional No. 60/441,307 y WO 2004/065540, cuyos contenidos totales de cada una están incorporados aquí para referencia en su totalidad. Las ABMs de la presente invención pueden alternativamente ser glicosideadas para tener residuos de fucosa reducidos en la Región Fc de acuerdo con las técnicas reveladas en EP 1 176 195 A1, cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia.

Generación de Líneas de Celula para la Producción de Proteínas con Patrón de Glicosilación Alterado

[0146] La presente invención provee sistemas de expresión de célula huésped para la generación de las ABMs de la presente invención, que tienen patrones de glicosilación modificados. En particular, la presente invención provee sistemas de célula huésped para la generación de glicoformas de las ABMs de la presente invención que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención provee sistemas de expresión de célula huésped seleccionados o diseñados para expresar un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Específicamente, tales sistemas de expresión de célula huésped pueden ser diseñados para comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene GnTIII, operativamente unida a un sistema promotor constitutivo o regulado.

[0147] En una realización específica, la presente invención provee una célula huésped que ha sido diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII, y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En un aspecto, la célula huésped es diseñada con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

[0148] Generalmente, se puede usar cualquier tipo de línea de célula cultivada, incluyendo las líneas de célula discutidas anteriormente, como un patrón para diseñar las líneas de célula huésped de la presente invención. En una realización preferida, se usan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma P3X63 de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta, como la línea de célula patrón para generar las células huésped diseñadas de la invención.

[0149] Se contempla que la invención abarque cualquier célula huésped diseñada que expresa un polipéptido que tiene actividad GnTIII,

incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo como se definió aquí.

[0150] Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad GnTIII se pueden expresar bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Tales sistemas son bien conocidos en la técnica, e incluyen los sistemas discutidos anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII y que comprenden el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, están comprendidos dentro de un sistema de célula huésped, algunos de ellos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros son expresados bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII son determinados mediante métodos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de manchado al Occidente, análisis de manchas al Norte, análisis de expresión de gen reportero o medida de actividad GnTIII. Alternativamente, se puede emplear una lectina que se enlaza a productos biosintéticos de GnTIII, por ejemplo, lectina E4-PHA. Alternativamente, se puede usar un ensayo funcional que mide el enlace al receptor Fc aumentado o función efectora aumentada mediada por anticuerpos producidos por las células diseñadas con el ácido nucleico que codifican un polipéptido con actividad GnTIII.

Identificación de Transfectantes O Transformantes Que Expresan La Proteína Que Tiene Un Patrón de Glicosilación Modificado

[0151] Las células huésped que contienen la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tienen sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina y que expresan los productos de gen biológicamente activos, pueden identificarse mediante al menos cuatro criterios generales; (a) hibridización ADN-ADN o ADN-RNA; (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador"; (c) evaluación de el nivel de transcripción tal como se mide mediante la expresión de los respectivos transcritos de mRNA en la célula huésped; y (d) detección del producto de gen tal como se mide por medio de inmunoensayo o por su actividad biológica.

74
167

[0152] En el primer criterio, la presencia de la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede detectarse por medio de hibridización ADN-ADN o ADN-RNA utilizando pruebas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias de codificación respectivas, respectivamente, o porciones o derivados de las mismas.

[0153] En el segundo criterio, la expresión recombinante del sistema vector/huésped puede identificarse y seleccionarse con base en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (e. g., actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, transformación de fenotipo, formación de cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia de codificación de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII se insertan dentro de una secuencia de gen marcador del vector, pueden identificarse los recombinantes que contienen la secuencias de codificación respectivas mediante la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador puede colocarse en tándem con las secuencias de codificación bajo el control de promotor igual diferente utilizado para controlar la expresión de las secuencias de codificación. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia de codificación de la ABM de la invención y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII.

[0154] En el tercer criterio, la actividad transcripcional para la región codificante de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede evaluarse por medio de ensayos de hibridización. Por ejemplo, puede aislarse RNA y analizarse por medio de Northern blot (manchado hacia el Norte) utilizando una prueba homóloga a las secuencias de codificación de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII o porciones particulares del mismo. Alternativamente, pueden extraerse y ensayarse los

779

1

75
168

ácidos nucleicos totales de la célula huésped para hibridización de tales pruebas.

[0155] En el cuarto criterio, la expresión de los productos de la proteína pueden evaluarse inmunológicamente, por ejemplo mediante Western blots (manchado hacia el Oeste), inmunoensayos tales como radioinmuno-precipitación, inmunoensayos unidos a enzima y similares. La prueba final del éxito del sistema de expresión, sin embargo, involucra la detección de los productos de gen biológicamente activos.

Generación Y Uso de las ABMs Que Tienen Función Efectora Aumentada Incluyendo Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo

[0156] En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona glicomorfos de ABMs quiméricas que tienen sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 de murina y que tienen función efectora aumentada que incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. El diseño de glicosilación de anticuerpos ha sido descrita previamente. Ver, por ejemplo, la Patente U. S. No. 6,602,684, incorporada aquí en su totalidad para referencia .

[0157] Recientemente los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han producido resultados alentadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997); Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Se ha aprobado un IgG1 quimérico, no conjugado para el linfoma no Hodgkin de células B de grado inferior o folicular. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), mientras que otros mAb no conjugados, unos tumores de seno sólidos objetivo humanizados de IgG1, también han mostrado resultados promisorios en ensayos clínicos de fase III. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Los antígenos de estos dos mAbs se expresan altamente en sus respectivas células tumorales y los anticuerpos median la destrucción potente del tumor por medio de células efectoras *in vitro* e *in vivo*. En contraste, muchos otros mAbs no conjugados con finas especificidades de tumor no pueden disparar funciones efectoras de potencia suficiente para ser clínicamente útiles. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-

171

33 (1997); *Surfus et al., J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Actualmente se está probando terapia adjunta de citosina para algunos de estos mAbs más débiles. La adición de citosinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) por medio del 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 células de anticuerpo objetivo, se dispara por el enlace de receptores de leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo *et al., Immunology Today* 18: 127 (1997).

[0158] Un criterio diferente, pero complementario, para incrementar la actividad ADCC de IgG1s no conjugados es diseñar la región Fc del anticuerpo. Los estudios de diseño de proteína han mostrado que los FcγRs interactúan con la región eje inferior del dominio de IgG CH2. Lund *et al., J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996). Sin embargo, el enlace FcγR también requiere de la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al Asn 297 conservado en la región CH2. Lund *et al., J. Immunol.* 157: 4963- 69 (1996); Wright y Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997), sugiriendo que tanto el oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que se requiere del oligosacárido para mantener una conformación de polipéptido CH2 activa. La modificación de la estructura del oligosacárido puede, por lo tanto, explorarse como un medio para incrementar la afinidad de la interacción.

[0159] Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos N-enlazados en su región Fc, uno sobre cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, se produce un anticuerpo como una población de glicomorfos que comparten el mismo marco de polipéptido pero que tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos normalmente encontrados en la región Fc de IgG de suero son de tipo complejo bi-antenario (Wormald *et al., Biochemistry* 36: 130-38 (1997), con un bajo nivel de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección, y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación de núcleo. Algunos estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidratos requerida para el enlace de FcγR yace dentro del núcleo de oligosacárido. Lund *et al., J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996).

[0160] Las líneas celulares derivadas de ratón o hámster utilizadas en la industria y la academia para la producción de mAbs terapéuticos no conjugados normalmente unen el oligosacárido requerido determinante para los sitios Fc. Los IgGs expresados en esas líneas celulares carecen, sin embargo, de la GlcNAc de bisección encontrada en bajas cantidades en IgGs de suero. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). En contraste, se ha observado recientemente que un IgG1 producido de mieloma de rata, humanizado (CAMPATH-1H) portaba una GlcNAc de bisección en algunos de sus glicomorfos. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). El anticuerpo derivado de célula de rata alcanzó una actividad ADCC in vitro máxima similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándar, pero en concentraciones significativamente inferiores de anticuerpo.

[0161] Normalmente el antígeno de CAMPATH está presente en altos niveles en células de linfoma, y este mAb quimérico tiene alta actividad ADCC en ausencia de una GlcNAc de bisección. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). En la ruta de glicosilación N-enlazada, se adiciona una GlcNAc de bisección por GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64: 163-81 (1986).

[0162] Estudios previos utilizaron una línea celular CHO sencilla de producción de anticuerpo, que se diseñó previamente para expresar, de una manera regulada externamente, niveles diferentes de una enzima de de GnT III clonado (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Esta aproximación estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad ADCC del anticuerpo modificado. Por lo tanto, la invención contempla un anticuerpo recombinante, quimérico o un fragmento del mismo con la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina, que tiene una glicosilación alterada resultante de la actividad GnTIII aumentada. La actividad GnTIII aumentada resulta en un incremento en el porcentaje de oligosacáridos bisecados, así como también una disminución en el porcentaje de residuos de fucosa, en la región Fc del ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, tiene una afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y una función efectora aumentada. Adicionalmente, la

invención está dirigida a un fragmento de anticuerpo y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas.

Aplicaciones Terapéuticas de ABMs Producidas De Acuerdo con los Métodos de la invención.

[0163] Las ABMs de la presente pueden utilizarse solas para apuntar y matar células tumorales in vivo. Las ABMs pueden utilizarse además en conjunto con un agente terapéutico apropiado para tratar el carcinoma humano. Por ejemplo, las ABMs pueden utilizarse en combinación con métodos de tratamiento estándar o convencionales tales como quimioterapia, terapia de radiación o pueden conjugarse o unirse a un fármaco terapéutico, o toxina, así como también a una linfoquina o a un factor de crecimiento inhibidor de tumor, para liberar el agente terapéutico al sitio del carcinoma. Los conjugados de las ABMs de esta invención que son de primera importancia son (1) inmunotoxinas (conjugados de la ABM y una mitad citotóxica) y (2) ABMs marcadas (por ejemplo radiomarcado, marcaje con enzima, o fluorocromo-marcado) en los cuales el marcado proporciona medios para la identificación de complejos inmunes que incluyen la ABM marcada. Las ABMs también pueden utilizarse para inducir lisis a través del proceso complementario natural, y para interactuar con células citotóxicas dependientes de anticuerpo normalmente presentes.

[0164] La mitad 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 tal toxina. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas utilizadas son la cadena A de difteria, fragmentos no de enlaces activos de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y enomicina. En otra realización, las ABMs se conjugan con moléculas pequeñas de fármacos anticáncer. Los conjugados de la ABM y tales mitades citotóxicas se hacen utilizando una variedad de de agentes de

acoplamiento de proteína bifuncionales. Ejemplos de tales reactivos son SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres tales como dimetil adipimidato HCl, ésteres activos tales como disuccinimidil suberato, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos bis-azido tales como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina, derivados de bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos tales como tolién 2,6-diisocianato, y compuestos de flúor bis-activos tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno. Puede unirse la porción lisante de una toxina al fragmento Fab de los ABMs. Las toxinas adicionales apropiadas son conocidas en el estado de la técnica, tal como se evidencia en por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0128448 publicada, aquí incorporada en su totalidad por referencia.

[0165] En una realización, se conjuga una ABM quimérica, glicodiseñada que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina, a una cadena A de ricina. Más ventajosamente, la cadena A de ricina es deglicosidada y producida a través de medios recombinantes. Se describe un método ventajoso para hacer la inmunotoxina ricina en Vitetta et al., *Science* 238, 1098 (1987), incorporada aquí por referencia.

[0166] Cuando se utilizan para matar células de cáncer humano in vitro para propósitos de diagnóstico, los conjugados se añadirán típicamente al medio de cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. La formulación y modo de administración para uso in vitro no son críticos. Normalmente se utilizarán formulaciones acuosas que sean compatibles con el medio de cultivo o perfusión. La citotoxicidad puede leerse por medio de técnicas convencionales para determinar la presencia o el grado de cáncer.

[0167] Tal como se discutió anteriormente, puede prepararse un radiofarmacéutico citotóxico para el tratamiento del cáncer mediante la conjugación de un isótopo radioactivo (por ejemplo, I, Y, Pr) a una ABM quimérica, glicodiseñada que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina. Se entiende que el término "mitad citotóxica" tal como se utiliza aquí incluye tales isótopos.

[0168] En otra realización, se llenan liposomas con un fármaco citotóxico y se recubren los liposomas con las ABMs de la presente invención. Debido a que existen muchas moléculas CD20 sobre la superficie de la célula B maligna, éste método permite la liberación de grandes cantidades de fármaco hacia el tipo celular correcto.

[0169] Las técnicas para la conjugación de tales agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas (ver, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies'84 : Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506(1985) ; y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

[0170] Aún otras aplicaciones terapéuticas para las ABMs de la invención incluyen la conjugación o unión, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante, a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y el uso de ese conjugado anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco a un agente citotóxico en el sitio del tumor (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 by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzima Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4: 188-193 (1990)).

[0171] Aún otro uso terapéutico para las ABMs de la invención involucra el uso, bien sea no conjugado, en la presencia de complemento, o como parte de un conjugado anticuerpo-fármaco o anticuerpo-toxina, para remover células tumorales de la médula ósea de pacientes con cáncer. De

acuerdo con esta aproximación, la médula ósea autóloga puede purgarse ex vivo mediante tratamiento con el anticuerpo y se infunde de vuelta la médula dentro del paciente [ver, por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 81-88 (1988)].

[0172] Adicionalmente, se contempla que la invención comprende una inmunotoxina de cadena sencilla que comprende dominios de enlace a antígeno que permiten sustancialmente la misma especificidad de enlace que el anticuerpo B-Ly1 de murina (por ejemplo, polipéptidos que comprenden las CDRs del anticuerpo B-Ly1 de murina) y que comprenden adicionalmente un polipéptido de toxina. Las inmunotoxinas de cadena sencilla de la invención pueden utilizarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

[0173] Similarmente, una proteína de fusión que comprende al menos la región de enlace a antígeno de una ABM de la invención unida a por lo menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tienen actividad anti-tumor, por ejemplo, una linfoquina u oncostatina, puede utilizarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

[0174] La presente invención proporciona un método para matar selectivamente células de tumor que expresan CD20. Este método comprende la reacción del inmunoconjugado (por ejemplo, la inmunotoxina) de la invención con dichas células de tumor. Estas células de tumor pueden ser de un carcinoma humano.

[0175] Adicionalmente, esta invención proporciona un método de tratamiento de carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este método comprende la administración a un sujeto de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que contiene al menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) de la invención.

[0176] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un método mejorado para el tratamiento de trastornos proliferativos de célula B que incluyen el linfoma de célula B, así como también una enfermedad autoinmune producida en la totalidad o en parte por autoanticuerpos

patogénicos, basada en el agotamiento de células B que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una ABM de la presente invención a un sujeto humano en necesidad del mismo. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo anti-CD20 glicodiseñado con una especificidad de enlace sustancialmente igual a la del anticuerpo B-Ly1 de murina. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no están limitados a, trombocitopenias Inmuno-mediadas, tales como púrpuras trombocitopénicas idiopáticas agudas y púrpuras trombocitopénicas idiopáticas crónicas, dermatomiositis, corea de Sydenham, nefritis lupus, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis pos-estreptocócica, eritema nodosum, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, eritema multiforme, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterans, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsalis, polimiografía, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosa, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel incluyendo soriasis y dermatitis (por ejemplo dermatitis atópica); escleroderma y esclerosis sistémicas; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino (tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa); síndrome de dolor respiratorio (incluyendo síndrome de dolor respiratorio adulto; ARDS); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; condiciones alérgicas tales como eczema y asma y otras condiciones que involucren la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocito; artritis reumatoidea; lupus eritematoso sistémico (SLE); diabetes mellitus (por ejemplo diabetes mellitus Tipo 1 o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Raynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomielitis alérgica; síndrome de Sjögren; ataque juvenil de diabetes; y respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citosinas y linfocitos T encontrados típicamente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que involucren la diapedesis de leucocito; enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (CNS); síndrome de

herida múltiple de órgano; anemia hemolítica (que incluye, pero no está limitada a crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana de basamento anti-glomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; bulous penfigoide; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome de hombre yerto; enfermedad de Behçet; arteritis de célula gigante; nefritis del complejo inmune; nefropatía IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o trombocitopenia autoinmune etc. En este aspecto de la invención, los ABMs de la invención se utilizan para vaciar la sangre de las células B normales durante un periodo extendido.

[0177] De acuerdo con la práctica de esta invención, el sujeto puede ser un humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino, y sujetos aviares. Otros animales de sangre caliente también están incluidos en esta invención.

[0178] La invención sujeto proporciona adicionalmente métodos para la inhibición del crecimiento de células tumorales humanas, tratamiento de un tumor en un sujeto, y tratamiento de una enfermedad tipo proliferativa en un sujeto. Estos métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad efectiva de la composición de la invención.

[0179] Es obvio, por lo tanto, que la presente invención abarca las composiciones, combinaciones y métodos farmacéuticos para el tratamiento de carcinomas humanos, tales como un linfoma de células B. Por ejemplo, la invención incluye composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de carcinomas humanos que comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0180] Las composiciones de ABM de la invención pueden administrarse utilizando modos convencionales de administración que incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directamente dentro del tumor. Se prefiere la administración intravenosa.

[0181] En un aspecto de la invención, las formulaciones terapéuticas que contienen las ABMs de la invención se preparan para almacenamiento por medio de la mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; preservativos (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no-iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[0182] Formulaciones ejemplares de ABM anti-CD20 se describen en WO98/56418, expresamente incorporada aquí por referencia. Esta publicación describe una formulación líquida multidosis que comprende 40 mg/mL de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, 0.9% de alcohol bencilico, 0.02% de polisorbato 20 a pH 5.0 que tiene una vida media mínima de dos años de almacenamiento a 2-8° C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/mL de rituximab en 9.0 mg/mL de cloruro de sodio, 7.35 mg/mL de citrato de sodio dihidratado, 0.7 mg/mL de polisorbato 80, y Agua Estéril para Inyección, pH 6.5. En la presente invención, se sustituirá RITUXAN® por una ABM de la presente invención.

[0183] Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen en WO97/04801. Tales formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado hasta una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida puede administrarse subcutáneamente al mamífero a ser tratado aquí.

[0184] La formulación de aquí también puede contener más de un compuesto activo tal como sea necesario para la indicación particular que esté siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afecten adversamente el uno al otro. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, citosina o agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúe sobre las células T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se enlace a las células T, por ejemplo, uno que se enlace a LFA-1). La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, el tipo de enfermedad o desorden o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración tal como las usadas aquí anteriormente o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones hasta aquí empleadas.

[0185] Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por medio de técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se revelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

[0186] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, matrices las cuales están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación

sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacilato), o poli(vinilalcohol)), polilacturos (Pat. U. S. No. 3,773, 919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuproluro), y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico. 179

[0187] Las formulaciones para ser utilizadas para administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0188] Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas de dosificación que incluyen, pero no están limitadas a, soluciones o suspensión líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida dependerá del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0189] Las composiciones de la invención también incluyen preferiblemente portadores y adyuvantes farmacéuticamente aceptables convencionales conocidos en el estado de la técnica tales como albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, y sales o electrolitos tales como sulfato de protamina.

[0190] El modo de administración y el régimen de dosificación más efectivos para las composiciones farmacéuticas de esta invención dependen de la severidad y curso de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el juicio del médico tratante. De acuerdo con lo anterior, las dosificaciones de las composiciones pueden ser tituladas para el paciente individual. Sin embargo, una dosis efectiva de las composiciones de esta invención generalmente estará en el rango de desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 2000 mg/kg.

[0191] Las moléculas aquí descritas pueden estar en una variedad de

formas de dosificación las cuales incluyen, pero no están limitadas a, soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida dependerá del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0192] La composición que comprende una ABM de la presente invención se formulará, dosificará, y administrará en una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores de consideración en este contexto incluyen la enfermedad o desorden particular que esté siendo tratado, el mamífero particular que esté siendo tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o desorden, el sitio de liberación del agente, el método de administración, el horario de administración, y otros factores conocidos para los practicantes médicos. La cantidad terapéuticamente efectiva del antagonista a ser administrado estará gobernada por tales consideraciones.

[0193] Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo administrado parenteralmente por dosis estará en el rango de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, estando el rango típico inicial de antagonista utilizado en el rango de aproximadamente 2 a 10 mg/kg.

[0194] En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humanizado. Dosis adecuadas para tal anticuerpo no conjugado están, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m². En una realización, la dosificación del anticuerpo difiere de la actualmente recomendada para RITUXANO®. Por ejemplo, uno puede administrar al paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² del anticuerpo, por ejemplo, donde la dosis esté en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m², por ejemplo desde aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m².

[0195] Más aún, uno puede administrar una o más dosis inicial(es) del anticuerpo seguida por una o más dosis subsecuente(s), en donde la dosis de mg/m² del anticuerpo en la dosis subsecuente(s) excede la dosis de

mg/m² del anticuerpo en la dosis inicial(es). Por ejemplo, la dosis inicial puede estar en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² (por ejemplo, desde aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m²) y la dosis subsecuente puede estar en el rango de aproximadamente 250 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m².

[0196] Tal como se anotó anteriormente, sin embargo, estas cantidades sugeridas de ABM están sujetas a una gran cantidad de discreción terapéutica. El factor clave en la selección de una dosis y horario apropiados es el resultado obtenido, tal como se indicó anteriormente. Por ejemplo, dosis relativamente más altas pueden necesitarse inicialmente para el tratamiento de enfermedades continuadas y agudas. Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o desorden, el antagonista se administra tan cerca como sea posible de la primera señal, diagnóstico, aparición, u ocurrencia de la enfermedad o desorden o durante las remisiones de la enfermedad o desorden.

[0197] La ABM de la presente invención se administra por medio de cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local inmunosupresor, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Adicionalmente, el antagonista puede administrarse adecuadamente por medio de infusión de pulso, por ejemplo, con dosis declinantes del antagonista. La dosificación se da preferiblemente por medio de inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0198] Uno puede administrar otros compuestos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citosinas con los antagonistas de aquí. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica sencilla, y la administración consecutiva en cualquier orden, en

donde existe preferiblemente un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[0199] Será claro que la dosis requerida de la composición de la invención para alcanzar curas puede reducirse adicionalmente con la optimización del horario.

[0200] De acuerdo con la práctica de la invención, el portador farmacéutico puede ser un portador lípido. El portador lípido puede ser un fosfolípido. Adicionalmente, el portador lípido puede ser un ácido graso. Además, el portador lípido puede ser un detergente. Tal como se utiliza aquí, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente bajándola.

[0201] En un ejemplo de la invención, el detergente puede ser un detergente no iónico. Ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero no están limitados a, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (polioxietilensorbitan monooleato), Brij, y Triton (por ejemplo Triton WR-1339 y Triton A-20).

[0202] Alternativamente, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, pero no está limitado a, bromuro de alquiltrimetilamonio.

[0203] Adicionalmente, de acuerdo con la invención, el portador lípido puede ser un liposoma. Tal como se utilice en esta solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a membrana que contiene cualquier molécula de la invención o combinaciones de las mismas.

[0204] Los ejemplos a continuación explican la invención en más detalle. Las siguientes preparaciones y ejemplos son proporcionados para facilitar a aquellos versados en la materia a entender más claramente y a practicar la presente invención. El alcance de la presente invención, sin embargo, no está limitado por las realizaciones ejemplificadas, las cuales se entienden como ilustraciones de aspectos sencillos de la invención únicamente, y los métodos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Realmente, diversas modificaciones de la

~~90~~

183

invención adicionalmente a aquellas aquí descritas serán aparentes para aquellos versados en la materia a partir de la descripción precedente y los dibujos acompañantes. Se entiende que tales modificaciones caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

786

EJEMPLOS

[NOTA: A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de aminoácidos específicos en los siguientes Ejemplos están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.]

EJEMPLO 1

Materiales y Métodos

Clonación y Expresión de Anticuerpo B-Ly1 Recombinante

[0205] Las células de hibridoma que expresan B-Ly1 crecieron en RPMI que contiene 10% de FBS y 4 mM de L-glutamina. Se cosecharon 6×10^8 células con una viabilidad > 90% y se aisló el RNA total utilizando un Qiagen RNeasy midi kit. Los cADNs que codifican las cadenas pesadas y ligeras variables de B-Ly1 se amplificaron por medio de RT-PCR. Se realizó la reacción de RT-PCR utilizando las siguientes condiciones: 30 min 50° C para la primera síntesis de hebra de cADN; 15 min 95° C desnaturalización inicial; 30 ciclos de 1 min 94° C, 1 min 45° C, 1.5 min 72° C; y un paso de elongación final durante 10 min a 72° C. El tamaño esperado de los productos de la PCR se confirmó por medio de electroforesis en gel. Los productos de la PCR se clonaron dentro de vectores adecuados de E. coli y el secuenciamiento de ADN confirmó que se aislaron los genes que codifican la cadena ligera y pesada variable.

[0206] Para la construcción de los vectores de expresión quiméricos de B-Ly1, se fusionaron secuencias de señal sintética y sitios de restricción apropiados a las cadenas variables por medio de reacciones adicionales de PCR. Después de una confirmación final de la secuencia correcta de ADN de las cadenas variables, se combinaron con las regiones constantes de IgG1 humano correspondientes. Una vez se construyeron los genes, se clonaron bajo control del promotor MPSV y hacia arriba de un sitio sintético de poliA, utilizando dos vectores separados, uno para cada cadena,

resultando en los plásmidos pETRI 808 (vector de expresión de cadena pesada) y pETR1813 (vector de expresión de cadena ligera). Cada vector portaba una secuencia EBV OriP.

[0207] Se produjo B-Ly1 quimérico por medio de co-transfección de células HEK293-EBNA con vectores pETR1808 y pETR1813 utilizando una aproximación de transfección de fosfato de calcio. Creciendo exponencialmente las células HEK293-EBNA se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio. Las células crecieron como cultivos de monocapa adherents en frascos T utilizando medio de cultivo DMEM complementado con FCS al 10%, y se transfectaron cuando estuvieron entre un 50 y 80% de confluencia. Para la transfección de un frasco T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM complementado con FCS (al 10% V/V final), 250, µg/ml de neomicina, y las células se colocaron a 37° C en un incubador con una atmósfera al 5% de CO₂ durante la noche. Para cada frasco T75 a ser transfectado, se prepare una solución de ADN, CaCl₂ y agua por medio de la mezcla de 47 µg del vector de ADN plásmido total dividido equitativamente entre los vectores de expresión de la cadena ligera y pesada, 235 µl de una solución 1M de CaCl₂, y adicionando agua hasta un volumen final de 469 µl. A esta solución, se adicionaron 469 µl de una solución de HEPES 50mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM a pH 7.05, mezclados inmediatamente durante 10 seg y dejados a temperatura ambiente durante 20 seg. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM complementado con FCS al 2%, y se añadió al T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37° C, 5% CO₂ durante aproximadamente 17 a 20 horas, posteriormente se reemplazó el medio con 12 ml de DMEM, FCS al 10%. Para la producción de anticuerpo "chB-Ly1" no modificado, las células se transfectaron únicamente con vectores de expresión de anticuerpo pETR1808 y pETR1813 en una proporción 1:1. Para la producción del anticuerpo "chB-Ly1-ge" glicodiseñado, las células se co-transfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión del anticuerpo (pETR1808 y pETR1813), uno para la expresión de un polipéptido GnTIII de fusión (pETR1519), y uno para la expresión de manosidasa II (pCLF9) en una proporción de 4:4:1:1, respectivamente. En el día 5 post-transfección, se cosechó el sobrenadante,

se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm, seguido por una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvo a 4° C.

[0208] Se purificaron chB-Ly1 y chB-Ly1-ge a partir del sobrenadante del cultivo utilizando tres pasos cromatográficos secuenciales, cromatografía de Proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, un paso de cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando la solución amortiguadora por una solución amortiguadora salina de fosfato y recolectando el pico del anticuerpo monomérico a partir de este último paso. Se estimó la concentración del anticuerpo utilizando un espectrofotómetro desde la absorbancia a 280 nm.

Análisis de Oligosacárido

[0209] Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente a partir de los anticuerpos mediante digestión de PNGasaF, con los anticuerpos siendo bien sea inmovilizados sobre una membrana PVDF o en solución.

[0210] La solución resultante digerida que contienen los oligosacáridos liberados se preparó bien sea directamente por análisis MALDI/TOF-MS o se digirió adicionalmente con EndoH glicosidasa antes de la preparación de la muestra para análisis MALDI/TOF-MS.

Método de liberación de oligosacárido para anticuerpos inmovilizados en membrana PVDF

[0211] Los pozos de una placa de 96 pozos hecha con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) se humedecieron con 100 µl de metanol y el líquido se dirigió a través de la membrana de PVDF utilizando vacío aplicado al Multitamiz de vacío múltiple (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Los pozos se lavaron posteriormente con 50 µl de solución amortiguadora de RCM (Urea 8M, Tris 360 mM, EDTA 3.2mM, pH 8.6). Se cargaron entre 30-40 µg de anticuerpo en un pozo que contiene 10 µl de solución amortiguadora de RCM. Se dirigió el líquido en el pozo a

través de la membrana mediante la aplicación de vacío, y la membrana se lavó subsecuentemente dos veces con 50 µl de solución amortiguadora de RCM. La reducción de los puentes disulfuro se desarrolló mediante la adición de 50 µl de ditioneitol 0.1M en RCM e incubación a 37° C durante 1 h.

[0212] Después de la reducción, se aplicó vacío para remover la solución de ditioneitol del pozo. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µl de agua antes de desarrollar la carboximetilación de los residuos de cisteína mediante la adición de 50 µl de ácido yodoacético 0.1M en solución amortiguadora de RCM e incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

[0213] Después de la carboximetilación, los pozos se aspiraron con vacío y se lavaron subsecuentemente tres veces con 300 µl de agua. La membrana PVDF se bloqueó posteriormente, para prevenir la adsorción de la endoglicosidasa, mediante la incubación de 100 µl de una solución acuosa al 1% de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo de bloqueo se removió posteriormente mediante vacío suave seguido por tres lavados con 300 µl de agua.

[0214] Los oligosacáridos N-enlazados se liberaron mediante la adición de 2.5 mU de péptido-N-glicosidasa F (N-Glicanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0.1 mU de Sialidasa (GLYKO, Novato, CA), para remover cualquier residuo potencial de monosacárido cargado, en un volumen final de 25 µl en NaHCO₃ 20mM, pH7.0). La digestión se desarrolló durante 3 horas a 37° C.

Método de liberación de oligosacárido para anticuerpos en solución

[0215] 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.

Uso de digestión de Endoglicosidasa H de oligosacáridos PNGasaF-liberados para la asignación de estructuras de oligosacárido bisecado híbrido para picos de oligosacárido neutro MALDI/TOF-MS

[0216] Los oligosacáridos PNGasaF liberados se digirieron subsecuentemente con endoglicosidasa H (EC 3.2. 1.96). Para la digestión de EndoH, se añadieron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) a la digestión de PNGasaF (método anterior de anticuerpo en solución) para dar un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37° C. La EndoH se divide entre los residuos de N-acetilglucosamina del núcleo quitobiosa de los oligosacáridos N-enlazados. La enzima únicamente puede digerir oligomanosa y la mayoría de glicanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizan.

Preparación de la muestra para MALDI/TOF-MS

[0217] Las digestiones enzimáticas que contienen los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h adicionales al ambiente durante la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y se pasaron subsecuentemente a través de 0.6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) empacada dentro de una columna cromatográfica micro-bio-giro (BioRad, Suiza) para remover los cationes y proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa objetivo de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz de sDHB. La matriz de sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0.1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron con aire, se aplicaron 0.2 µl de etanol, y se permitió finalmente que las muestras se re-cristalizaran bajo aire.

MALDI/TOF-MS

[0218] El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para adquirir los espectros de masas era un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20kV

y retraso de 80 ns. Se empleó la calibración externa utilizando estándares de oligosacárido para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 disparos láser se sumaron para obtener el espectro final.

Depleción de células B en sangre entera

[0219] Se alicuotaron 495 µl de sangre heparinizada a partir de un donador saludable en tubos de 5 ml de poliestireno, se añadieron únicamente 5 µl de muestras de anticuerpo concentrado 100 veces (concentración final 1-1000 ng/ml) o PBS y los tubos se incubaron a 37°. Después de 24h se transfirieron 50 µl de sangre a un tubo fresco y se tiñeron con anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE y anti-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Antes del análisis, se añadieron 500 µl de solución amortiguadora FACS (PBS que contiene FCS 2% y EDTA 5mM) a los tubos. La fluorescencia CD3-FITC y CD19-PE de las muestras de sangre se analizaron flujocitométricamente ajustando un umbral sobre CD45-CyChrome. La depleción de células B se determinó por medio de la graficación de la proporción de células CD19⁺B a células CD3⁺T.

Enlace de Anticuerpos anti-CD20 a Células Raji

[0220] Se transfirieron 500.000 en 180 µl de solución amortiguadora FACS (PBS que contiene FCS 2% y EDTA 5mM) a tubos de 5 ml de poliestireno y se añadieron únicamente 20 µl de muestras de anticuerpo anti-CD20 concentradas 10 veces (concentración final 1-5000 ng/ml) o PBS y se incubaron los tubos a 4° C durante 30 min. Subsecuentemente, las muestras se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS y se peletizaron a 300 x g durante 3min. El sobrenadante se aspiró y las células se recogieron en 100 µl de solución amortiguadora FACS y se adicionó 1 µl de fragmentos F(ab')₂-FITC anti-Fc-específico (Jackson Immune Research Laboratories, USA) y los tubos se incubaron a 4° C durante 30 min. Las muestras se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS y se recogieron en 500 µl de solución amortiguadora FACS que contiene 0.5 µg/ml de PI para análisis mediante Citometría de Flujo. El enlace se determinó por medio de la graficación de la media geométrica de la fluorescencia contra las concentraciones de anticuerpo.

EJEMPLO 2

Criterio de Aceptor de Alta Homología

[0221] Se desarrolló la búsqueda del marco aceptor de anticuerpo de alta homología mediante la alineación de la secuencia de proteína B-ly1 de ratón a una colección de secuencias humanas de línea germinal y seleccionando la secuencia humana que mostró la más alta identidad de secuencia. Aquí, la secuencia VH1_10 de la base de datos VBase se escogió como la secuencia de marco aceptor de cadena pesada, y se escogió que la secuencia VK240 fuera el marco aceptor para la cadena ligera. Sobre estos dos marcos aceptores, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los dominios variables pesados y ligeros de ratón. Dado que la región 4 del marco no es parte de la región variable de la línea germinal del gen V, la alineación para esa posición se hizo individualmente. La región JH4 se escogió para la cadena pesada, y la región JK4 se escogió para la cadena ligera. El modelamiento molecular del dominio de inmunoglobulina diseñado reveló una mancha que requiere potencialmente de los residuos aminoácidos de murina en lugar de los humanos fuera de la CDR. La re-introducción de los residuos aminoácidos de murina dentro del marco humano podría generar las así denominadas mutaciones de vuelta. Por ejemplo, el residuo aminoácido del aceptor humano en la posición Kabat 27 mutó de vuelta a un residuo tirosina. Se designó que los variantes de anticuerpo humanizado bien sea incluyeran u omitieran las mutaciones de vuelta. La cadena ligera de anticuerpo humanizado no requiere de ninguna mutación de vuelta. Después de haber diseñado las secuencias de proteína, se sintetizaron las secuencias de ADN que codifican estas proteínas tal como se detalla a continuación.

Criterio del Marco Mezclado

[0222] Con el fin de evitar la introducción de mutaciones de vuelta en posiciones críticas de residuo de aminoácido (críticas para retener buena afinidad de enlace de antígeno o funciones del anticuerpo) del marco aceptor humano, se investigó si bien la región 1 de marco completa (FR1), o las regiones 1 (FR1) y 2 (FR2) de marco juntas, podrían ser reemplazadas por

secuencias de anticuerpo humano que ya tuvieran residuos donadores, o aquellos funcionalmente equivalentes, en aquellas posiciones importantes en la secuencia natural de línea germinal humana. Para este propósito, los marcos 1 y 2 VH de la secuencia Bly1 de ratón se alinearon individualmente para secuencias de línea germinal humana. Aquí, la más alta identidad de secuencia no era importante, y no se utilizó, para la elección de los marcos aceptores, sino que en su lugar se asumió que era más importante el emparejamiento de diversos residuos críticos. Aquellos residuos críticos comprenden los residuos 24, 71, y 94 (numeración Kabat), y también aquellos residuos en la posición 27, 28, y 30 (numeración Kabat), que yacen fuera de la definición de la CDR1 por Kabat, pero que a menudo están involucrados en el enlace de antígeno. Se escogió a la secuencia IMGT V_H_3_15 como la más adecuada. Después de haber diseñado las secuencias de proteína, se sintetizaron las secuencias de ADN que codifican estas proteínas tal como se detalla más abajo. Utilizando esta aproximación no se requirieron mutaciones de vuelta bien sea para la cadena ligera o pesada, con el fin de retener buenos niveles de enlace a antígeno.

Síntesis de los genes de anticuerpo

[0223] Después de haber diseñado la secuencia de aminoácido de la región de anticuerpo V humanizado, tiene que generarse la secuencia de ADN. Se encontraron los datos de la secuencia ADN de las regiones individuales de marco en la bases de datos para secuencias de línea germinal humana. La secuencia ADN de las regiones CDR se tomó de los datos correspondientes de cADN de murina. Con estas secuencias, se ensambló virtualmente la secuencia ADN completa. Teniendo estos datos de la secuencia ADN, se introdujeron los diagnósticos de los sitios de restricción en la secuencia virtual, por medio de la introducción de las mutaciones silenciosas, creando sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena física de ADN, se desarrolló la síntesis del gen (por ejemplo, Wheeler et al. 1995). En este método, los oligonucleótidos se diseñaron a partir de los genes de interés, de tal forma, que una serie de oligonucleótidos se deriva de la hebra codificante, y otra serie proviene de la hebra no codificante. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último en la fila) siempre muestran secuencias complementarias para dos promotores derivados de la hebra

opuesta. Cuando se colocan estos oligonucleótidos dentro de una solución amortiguadora de reacción adecuada para cualquier polimerasa estable al calor, y se adicionaron Mg^{2+} , dNTPs y una polimerasa ADN, cada oligonucleótido se extendió desde su extremo 3'. El extremo 3' nuevamente formado de un promotor se refuerza posteriormente con el siguiente promotor de la hebra opuesta, y extiende su secuencia adicionalmente bajo condiciones adecuadas para la elongación de la cadena de ADN dependiente del template. El producto final se clonó dentro de un vector convencional para propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpo

[0224] Se adicionaron secuencias líder de cadena pesada y ligera humanas (para secreción) hacia arriba de las secuencias de región variable anteriores y estas se unieron posteriormente hacia arriba de secuencias de cadena pesada y ligera constantes de IgG1 kappa humano, respectivamente, utilizando técnicas de biología molecular estándar. Las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera de anticuerpo total resultantes se subclonaron dentro de vectores de expresión mamífera (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y hacia arriba de un sitio de poliA sintético, portando cada vector una secuencia EBV OriP, tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior. Los anticuerpos se produjeron como se describió en el Ejemplo 1 anterior, especialmente por medio de co-transfección de HEK293-EBNA con los vectores de expresión de cadena pesada y ligera del anticuerpo mamífero, cosechando 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, seguida por cromatografía de intercambio catiónico y un paso cromatográfico final de exclusión por tamaño para aislar los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. Los anticuerpos se formularon en una solución 25 mM de fosfato de potasio, 125 mM de cloruro de sodio, 100 mM de glicina de pH 6.7. Los variantes glicodiseñados de los variantes de anticuerpo humanizado se produjeron por medio de co-transfección de los vectores de expresión de anticuerpo junto con unos vectores de expresión de GnT-III glicosiltransferasa, o junto con un vector de expresión de GnT-111 más un vector de expresión de Golgi manosidasa II, tal como se describió para el anticuerpo quimérico en el Ejemplo 1 anterior.

Los anticuerpos glicodiseñados se purificaron y formularon tal como se describió anteriormente para los anticuerpos no glicodiseñados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizó por medio de MALDI/TOF-MS tal como se describe a continuación.

Análisis de oligosacárido

[0225] Método de liberación de oligosacárido 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.

Preparación de la muestra para MALDI/TOF-MS

[0226] Los digestos enzimáticos que contienen los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h adicionales a temperatura ambiente después de la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y se pasaron subsecuentemente a través de 0.6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) empacada dentro de una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para remover los cationes y proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa objetivo de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz de sDHB. La matriz de sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0.1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron con aire, se aplicaron 0.2 µl de etanol, y se permitió finalmente que las muestras se re-cristalizaran bajo aire.

MALDI/TOF-MS

[0227] El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para adquirir los espectros de masas era un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20kV y retraso de 80 ns. Se empleó la calibración externa utilizando estándares de

oligosacárido para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 disparos láser se sumaron para obtener el espectro final.

Ensayo de Enlace a antígeno

[0228] Se evaluaron los variantes anticuerpo humanizado monomérico, purificadas para enlace a CD20 humano sobre células objetivo de linfoma de célula B de Raji utilizando un ensayo basado en citometría de flujo, tal como se describió para el anticuerpo quimérico B-Iy1 en el Ejemplo 1 anterior.

Enlace de glicovariantes de IgG1 monomérico a células NK y a línea celular CHO que expresa Fc RIIIA

[0229] Se aislaron células NK humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica recientemente aisladas (PBMC) aplicando un enriquecimiento de selección negativo para células CD16 y CD56 positivas (sistema MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Alemania). La pureza determinada mediante la expresión de CD56 estuvo entre 88-95%. Se incubaron células NK recientemente aisladas en PBS sin iones calcio y magnesio (3×10^5 células/ml) durante 20 minutos a 37° C para remover IgG asociado a célula NK cell. Las células se incubaron a 10^6 células/ml en diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD20 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$) en PBS, BSA 0.1 %. Después de varios lavados se detectó el anticuerpo de enlace mediante la incubación con 1: 200 de FITC-conjugado F(ab')_2 cabra anti-humano, IgG F(ab')_2 específico (JacksonImmunoResearch, West Grove, PA/USA) y CD56-PE anti-humano (BD Biosciences, Allschwil/Suiza). Los fragmentos anti-Fc γ RIIIA 3G8 F(ab')_2 (Ansell, Bayport, MN/USA) se adicionaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta completar el enlace de los glicovariantes de anticuerpo (3 $\mu\text{g/ml}$). Se determinó la intensidad de fluorescencia referida a los variantes de anticuerpo unidos para células positivas CD56 en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil /Suiza). Las células CHO se transfectaron por medio de electroporación (280 V, 950 μF , 0.4 cm) con un vector de expresión codificante para la cadena α y la cadena γ de Fc γ RIIIA-Val158. Los transfectantes se seleccionaron mediante la adición de 6 $\mu\text{g/ml}$ de

puromicina y los clones estables se analizaron por medio de FACS utilizando 10 µl de anticuerpo monoclonal FITC-conjugado-anti-FcγRIII 3G8 (BD Biosciences, Allschwil/Suiza) para 10⁶ células. El enlace de IgG1 a células CHO que expresan FcγRIIIA-Vall58 se desarrolló de manera análoga al enlace de célula NK descrito anteriormente.

Ensayo ADCC

[0230] Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y se prepararon utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) y siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En breve, se tomó sangre venosa de voluntarios con jeringas heparinizadas. La sangre se diluyó 1:0.75-1.3 con PBS (que no contiene Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺) y se acodó sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente (RT) sin freno. La interfase que contiene la PBMC se recolectó y se lavó con PBS (50 ml por células de dos gradientes) y se cosechó mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a RT. Después de la resuspensión del pellet con PBS, se contaron las PBMC y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a RT. Las células se resuspendieron posteriormente en el medio apropiado para los procedimientos subsecuentes.

[0231] La proporción de efector a objetivo utilizada para los ensayos de ADCC fue de 25:1 y 10:1 para PBMC y células NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la concentración apropiada con el fin de añadir 50 µl por pozo de placas de 96 pozos de fondo redondo. Las células objetivo eran células de linfoma B humano (por ejemplo, células de Raji) que crecieron en DMEM que contiene FCS10%. Las células objetivo se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0.3 millones por ml con el fin de añadir 30'000 células en 100 µl por micropozo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, añadido en 50 µl a las células objetivo pre-plaqueadas y se permitió que se unieran a los objetivos durante 10 minutos a RT. Posteriormente se adicionaron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37° C en una atmósfera humectada que contiene CO₂ 5%. Se evaluó la muerte de las células

objetivo mediante la medición de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de las células dañadas utilizando el kit de Detección de Citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Después de la incubación de 4 horas se centrifugaron las placas a 800 x g. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante de cada pozo a una nueva placa transparente de 96 pozos de fondo plano. Se adicionaron 100 µl de solución amortiguadora de sustrato de color del kit por pozo. Se determinaron los valores de Vmax de la reacción de color en un lector de ELISA a 490nm durante la menos 10 min utilizando un software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Se midió la liberación espontánea de LDH a partir de los pozos que contienen únicamente células objetivo y efectoras pero no anticuerpos. Se determinó la liberación máxima de los pozos que contienen únicamente células objetivo y 1% de Triton X-100. Se calculó el porcentaje de muerte mediada por anticuerpo específico como sigue: $((x-SR)/(MR-SR))*100$, donde x es la media de Vmax a una concentración específica de anticuerpo, SR es la media de Vmax de la liberación espontánea y MR es la media de Vmax de la liberación máxima.

Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento

[0232] Se contaron células objetivo, se lavaron con PBS, se resuspendieron en AIM-V (Invitrogen) a 1 millón de células por ml. Se plaquearon 50 µl de células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se prepararon las disoluciones de anticuerpo en AIM-V y se añadieron en 50 µl a las células. Se permitió que los anticuerpos se enlazaran a las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descongeló recientemente complemento de suero humano (Quidel), se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pozos. Se preparó complemento de conejo (Cedarlane Laboratories) tal como se describe por el fabricante, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pozos. Como un control, se calentaron fuentes de complemento durante 30 min a 56° C antes de la adición al ensayo.

Las placas de ensayo se incubaron durante 2h a 37° C. Se determinó la muerte de las células mediante la medición de la liberación de LDH. Brevemente, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 3 min. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante por pozo a una nueva placa de 96 pozos

y se adicionaron 50 μ l del reactivo de ensayo del Kit de Citotoxicidad (Roche). Una medida cinética con el lector de ELISA determinó la V_{max} correspondiente con la concentración de LDH en el sobrenadante. Se determinó la liberación máxima mediante la incubación de las células en presencia de 1% de Triton X-100.

Ensayo de depleción de célula B de sangre entera

[0233] El agotamiento de célula B normal en sangre entera por los anticuerpos anti-CD20 se llevó a cabo tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de apoptosis

[0234] Se ensayó la potencia apoptótica de los anticuerpos mediante la incubación del anticuerpo a 10 μ g/ml (condiciones de saturación con respecto al antígeno de enlace) con las células objetivo (a una concentración de célula objetivo de 5×10^5 células/ml) durante la noche (16-24 h). Las muestras se tiñeron con AnnV-FITC y se analizaron mediante FACS. El ensayo se hizo por triplicado.

[0235] Se realiza la detección mediante citometría de flujo al seguir la aparición de marcadores apoptóticos como anexina V y fosfatidil serina. El control negativo (sin apoptosis inducida) no contenía ningún anticuerpo, sino únicamente solución salina amortiguada de fosfato. El control positivo (apoptosis máxima) contenía 5 micromolar del inductor fuerte de apoptosis Camptotecina (CPT).

Resultados y Discusión

[0236] La comparación de los variantes de anticuerpo B-HH1, B-HH2, B-HH3, del antígeno de enlace a CD20 humano, bien sea acoplados con la cadena ligera de B-ly1 quimérico (mVL, tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior) o con la cadena ligera de B-ly1 (KV1) humanizado, y el anticuerpo chB-ly1 quimérico, de origen (descrito en el Ejemplo 1 anterior) mostró que todos los anticuerpos tienen un valor EC_{50} similar, pero el constructo B-HH1 se une con una intensidad/estequiometría inferior que los

variantes B-HH2 y B-HH3 (Figura 11). Puede distinguirse el B-HH1 del B-HH2 y B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición de Rabat), así como también por el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración de Kabat). Esto indica que bien sea la posición 28, la CDR1 completa, y/o la CDR2 completa son importantes para la interacción anticuerpo/antígeno.

[0237] La comparación del B-HL1, B-HH1, y el anticuerpo quimérico chB-ly1 de origen indicó la ausencia de cualquier actividad de enlace en el constructo B-HL1, y aproximadamente la mitad de la intensidad/estequiometría de enlace del B-HH1 comparado con el B-ly1 (Figura 12). Tanto el B-HL1 así como también B-HH1 se diseñaron con base en marcos aceptores derivados de la clase del VH1 humano. Entre otras diferencias, la posición 71 (Numeración de Kabat; la posición 71 de Kabat corresponde a la posición 72 de SEQ ID NO:48) del constructo B-HL1 es una diferencia significativa, que indica su importancia putativa para antígeno de enlace.

[0238] Cuando se comparan los datos de enlace de antígeno de las Figuras 9 a 13, los variantes BHH2-KV1, BHL8-KV1, y BHL11-KV1 muestran la mejor afinidad de enlace, entre los diferentes variantes de anticuerpo humanizados evaluados, para CD20 humana sobre la superficie de células humanas. Las diferencias entre B-HH2, por un lado, y B-HL8 y B-HL11 por el otro se localizan únicamente en las regiones FR1 y FR2, siendo las tres CDRs idénticas (comparar, por ejemplo, SEQ ID NOs: 32, 56, y 60, los cuales no están numerados de acuerdo con Kabat, pero cuyas numeraciones de Kabat pueden ser determinadas fácilmente por una persona versada en la materia. Los B-HL8 y B-HL11 tienen sus secuencias de FR1 y FR2 derivadas de la clase VH3 humana, mientras que el marco de B-HH2 completo se deriva de VH1 humana. El B-HL11 es un derivado de B-HL8 con la mutación simple Glu1Gln (la posición 1 es la misma tanto en la numeración de Kabat y en el sistema de numeración convencional utilizado en el listado de secuencias), con Gln siendo el residuo de aminoácido en el constructo B-HH2. Esto significa que el intercambio de Glu1Gln no altera la afinidad de enlace ni la intensidad. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son 14 residuos del marco, de los cuales uno o más influirán el comportamiento de antígeno de enlace de este anticuerpo.

[0239] El constructo B-HL4 se deriva del anticuerpo B-HH2 mediante el reemplazo de FR1 del B-HH2 con aquel de la secuencia VH1_45 de la línea germinal humana. Este constructo enseña una capacidad de antígeno de enlace considerablemente disminuida, a pesar de tener aminoácidos diferentes en únicamente tres posiciones dentro de FR1. Estos residuos se localizan en las posiciones 2, 14, y 30 (Numeración de Kabat). De estas, la posición 30 puede ser una posición influyente, dado que hace parte de la definición de Chothia de la CDR1. Un análisis completo de todas las curvas de enlaces de las Figuras 9 a 13 indican que los siguientes residuos de cadena pesada de B-ly1 (Numeración de Kabat) son importantes para enlazar a CD20: N35 (extremo de CDR1 de Kabat), CDR1 de Kabat completa, CDR2 de Kabat completa y CDR3 de Kabat completa, residuos A71 y R94 (en este caso R94 no puede ser reemplazado por una treonina) y Y27. A28 y S30 también contribuyen en una medida menor. Adicionalmente la CDR3 de Kabat y todos los residuos canónicos son importantes para el antígeno de enlace. No se introdujeron mutaciones de vuelta en la cadena ligera humanizada, que tenía las CDR1, CDR2 y CDR3 de Kabat completas injertadas. En la inducción de apoptosis (Figuras 14,15 y 21), el variante más potente fue el variante BHH2-KV1 de B-ly1 humanizado (aún más potente que el chB-ly1 original y mucho más potente que un anticuerpo con una secuencia idéntica a rituximab, C2B8). Otros variantes humanizados (derivados de BHL8) que pueden recuperar la apoptosis aumentada son: B-HL12 a B-HL17 (ver Tabla) y BHH8 (amazones mezclados) y BHH9 ("amazones mezclados" con una mutación de vuelta, S30T). Las posiciones 9 y 48 (Numeración de Kabat) pueden contactar al antígeno. Los variantes BHH4 a BHH7 son otros variantes de B-ly1 humanizado que no introducen secuencias no-humanas adicionales.

[0240] Son propiedades importantes del anticuerpo B-ly1 humanizado que este es un anticuerpo anti-CD20 tipo II tal como se definió en Cragg, M. S. y Glennie, M. J., *Blood* 103 (7):2738-2743 (Abril 2004);. Por lo tanto no induce, después del enlace a CD20, ninguna resistencia significativa para la extracción por detergente no-iónico de CD20 a partir de la superficie de células humanas CD20+, empleando el ensayo descrito para este propósito en Polyak, M. J. y Deans, J. P., *Blood* 99(9): 3256-3262 (2002). Ciertamente induce significativamente menos resistencia a la extracción por detergente

no-iónico de CD20 de lo que lo hace en anticuerpo C2B8 (otro anticuerpo anti-CD20 con secuencia idéntica a rituximab, (ver Pat. Pub. U.S. No. 2003 0003097 para Ref). Tal como se espera de un anticuerpo anti-CD20, el B-ly1 inmunizado no tuvo ninguna actividad mediada por lisis complementaria significativa y ciertamente más actividad mediada por lisis complementaria que el anticuerpo C2B8 anti-CD20 (IgG1 quimérico con secuencia idéntica a rituximab). Otra propiedad importante del anticuerpo B-ly1 humanizado fue que el mismo fue muy potente en el ensayo de agregación homotípica. En este ensayo, se incubaron células humanas CD20-positivas, células de Daudi, en medio de cultivo celular durante hasta 24 horas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂ en un incubador de célula mamífera 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. Como una comparación, se hizo una incubación paralela, de control de las células bajo condiciones idénticas pero utilizando el anticuerpo C2B8 anti-CD20. Las células se inspeccionaron visualmente en diferentes puntos de tiempo, incluyendo 8 horas y 24 horas de incubación, utilizando un microscopio. Se encontró que el anticuerpo B-ly1 humanizado conduce a una fuerte agregación homotípica, con agregados que son significativamente más grandes que aquellos inducidos por la adición del anticuerpo en control C2B8. Adicionalmente, y consistente con que el anticuerpo sea un anti-CD20 tipo II, indujo niveles más altos de apoptosis cuando se incubaron las células CD20-positivas con el anticuerpo B-ly1 humanizado, con respecto al control bajo condiciones idénticas utilizando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con secuencia idéntica a rituximab.

[0241] Las variantes glicodiseñadas de los anticuerpos humanizados se produjeron mediante co-expresión de GnTIII glicosiltransferasa, junto con los genes de anticuerpo, en células de mamífero. Esto condujo a un incremento en la fracción de oligosacáridos no-fucosilados unidos a la región Fc de los anticuerpos, incluyendo los oligosacáridos no-fucosilados bisecados, tal como han sido descritos en WO 2004/065540 (Figuras 17-19). Los anticuerpos glicodiseñados tienen niveles significativamente más altos de enlace a receptores FcγRIII humanos (Figura 20) y como también actividad ADCC actividad (Figura 16), con respecto al anticuerpo no-glicodiseñado y con respecto al anticuerpo C2B8. El anticuerpo humanizado

B-ly1 también fue más potente en la inducción del agotamiento de célula B humana en un ensayo de sangre entera (Figura 16) que el anticuerpo de control C2B8. Esto fue cierto tanto para el anticuerpo B-ly1 no-glicodiseñado y para la versión glicodiseñada del mismo. El anticuerpo glicodiseñado fue aproximadamente 1000 veces más potente que el anticuerpo de control C2B8 anti-CD20 en el agotamiento de las células B en el ensayo de sangre entera. Esta comparación es importante tanto para las formas del anticuerpo B- ly1 no-glicodiseñadas y para las glicodiseñadas humanizadas, porque mostró en ensayos que las actividades combinadas dependientes del receptor Fc, tales como ADCC, más lisis mediada por complemento más inducción de apoptosis, que ambas formas de B-ly1 fueron significativamente más potentes que C2B8, aunque ambas formas de B-ly1 tienen actividad de lisis mediada por complemento dramáticamente inferiores. El ADCC, las actividades de muerte celular dependientes de receptor Fc y la inducción de apoptosis se presentaron en esta actividad superior de los variantes del anticuerpo B-ly1 humanizado. Adicionalmente, en el ensayo de apoptosis, tanto las formas glicodiseñadas y no-glicodiseñadas de este anticuerpo anti-CD20 tipo II fueron potentes, con los variantes Fc-diseñados con afinidad de enlace aumentada para los receptores Fcgamma siendo aún más potente en la inducción de apoptosis que el variante no-Fc-diseñado, y con todos los variantes siendo significativamente más potentes que el anticuerpo C2B8 de control. No se conoce el mecanismo exacto para la agregación homotípica mejorada y la inducción de apoptosis mediada por anticuerpos anti-CD20 tipo II y el enlace concomitante a otras moléculas sobre la superficie de células CD20-positivas, tales como los receptores Fc gamma, puede influir en esta importante propiedad. Por lo tanto, fue importante demostrar que los anticuerpos anti-CD20 de tipo II que han sido diseñados en su región Fc para afinidad de enlace aumentada a receptores Fc gamma, que incluyen FcgammaRIII y con un incremento asociado en la actividad ADCC, seguirán siendo capaces de inducir apoptosis fuerte, incluso mayor que los no Fc-diseñados, y agregación homotípica. La inducción de apoptosis es importante como in vivo, ya que existen localizaciones en el cuerpo donde las células CD20- positivas objetivo pueden encontrarse, pero en donde el acceso a las células FcgammaRIII-positivas es más difícil que en la sangre, tales localizaciones son, por ejemplo, nodos linfáticos. En aquellas localizaciones, la inducción de apoptosis mediante el anticuerpo anti-CD20

en sí mismo puede ser crucial para la buena eficacia de la terapia de anticuerpo anti-CD20 en humanos, tanto para el tratamiento de malignidades hematológicas tales como los linfomas de no-Hodgkins y la leucemia linfocítica de células B crónica, y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y el lupus a través de una aproximación de agotamiento de células B. La afinidad de enlace aumentada para FcγRIII y ADCC más alta del anticuerpo anti-CD20 tipo II humanizado, Fc-diseñado también puede ser un atributo muy importante para tales terapias. Finalmente, la actividad de lisis mediada por complemento reducida o despreciable de estos anticuerpos anti-CD20 de tipo II, que incluyen variantes humanizadas y Fc-diseñadas, también puede ser una activación por complemento importante más alta mediante los anticuerpos anti-CD20 que ha sido correlacionada con efectos laterales aumentados, no deseables.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende
 - a. una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO : 7; y
 - b. una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO:21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; y
 - c. secuencia ID NO : 24.
2. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10.
3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que codifica un polipéptido de fusión.
4. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID No.: 3.
5. Un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID No.: 4.
6. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
8. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 4, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.
9. Un polinucleótido aislado que comprende
 - a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento del, de una especie diferente a la de ratón.

10. Un polinucleótido aislado que comprende

a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

11. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No. : 1.

12. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 2.

13. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO. : 11.

14. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID NO.: 12.

15. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO.: 12.

16. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

17. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

18. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a la SEQ ID NO.: 11 o a la SEQ ID NO. : 12.

19. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a la SEQ ID NO.:11 o a la SEQ ID NO.:12.

20. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:13 (cadena pesada aa).

21. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:14 (cadena ligera aa).

22. Un polinucleótido aislado que comprende

a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región V_H del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes del mismo; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

23. Un polinucleótido aislado que comprende

a. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región V_L del anticuerpo B-Ly1 de murina, o variantes del mismo; y

b. una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

24. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23.

25. El vector de la reivindicación 24, en donde dicho vector es policistrónico.

26. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 24.

27. Una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23.

28. Un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 de murina y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.
29. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido de la reivindicación 28.
30. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 29, que se enlaza a CD20 humano.
31. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 29, que es un anticuerpo.
32. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo quimérico.
33. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo humanizado.
34. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 31, que es un anticuerpo primatizado.
35. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma.
36. Un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO : 2 o una variante de la misma.
37. Un polipéptido quimérico que comprende:
 - a. un polipéptido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO: 17; y
 - b. un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27; y
 - c. SEQ ID NO: 28.

38. Un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 37, que además comprende un marco de región variable de cadena pesada, e donde dicho marco comprende un residuo de alanina en la posición 71, de acuerdo a la numeración Kabat.
39. Un polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 37, que comprende además un marco de región variable de cadena pesada, en donde dicho marco comprende un residuo de arginina en la posición 94, de acuerdo con la numeración Kabat.
40. Un polipéptido quimérico que comprende la SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 20.
41. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO:13 o una variante de la misma.
42. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 14 o una variante de la misma.
43. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-40, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.
44. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 43.
45. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.
46. El anticuerpo de la reivindicación 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo primatizado.
47. El anticuerpo de la reivindicación 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
48. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 44, en

donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

49. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 48, en donde dicho fragmento de anticuerpo es primatizado.

50. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 48, en donde dicho fragmento de anticuerpo es humanizado.

51. Una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es quimérica.

52. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

53. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 52, en donde dicho anticuerpo es primatizado.

54. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicho anticuerpo recombinante es humanizado.

55. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 51, en donde dicho anticuerpo recombinante comprende una Región Fc humana.

56. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 55, en donde dicha Región Fc humana es la Región Fc de IgG humana.

57. Una molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 29-34 o 44-56, dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene una Región Fc con oligosacáridos modificados.

58. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicha Región Fc ha sido modificada para tener residuos de mucosa reducidos comparados con molécula que se enlaza a antígeno no modificada.

59. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dicha Región Fc tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados.

60. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 59, en donde dichos oligosacáridos modificados con complejos, bisecados.

61. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados, bisecados en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno.

62. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados, bisecados son híbridos.

63. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 61, en donde dichos oligosacáridos no fucosilados, bisecados son complejos.

64. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

65. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

66. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

67. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

68. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 humano, y en donde dicha molécula de enlace a antígeno es quimérica; dicho método comprende

a. cultivar la célula huésped de la reivindicación 26 o reivindicación 27 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b. recuperar dicha molécula que se enlaza a antígeno del cultivo resultante.

69. El método de la reivindicación 68, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

70. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-34 o 46-67 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

71. La composición farmacéutica de la reivindicación 70, en donde dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

72. La composición farmacéutica de la reivindicación 70, en donde dicha composition comprende además un adyuvante.

73. Una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de un polipéptido producido por dicha célula huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 44-67.

74. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

75. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

76. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

77. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región equivalente a la Región Fc de un IgG humano.

78. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada como resultado de dicha modificación.

79. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe función efectora aumentada como resultado de dicha modificación.

80. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

81. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 74, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

82. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 81, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II.

83. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 81, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1, 2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

84. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 81, en donde

dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1, 2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

85. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 81, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa I.

86. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 81, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo $\alpha 1-6$.

87. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

88. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

89. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

90. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

91. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos.

92. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

93. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

94. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 79, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

95. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 78, en donde dicho receptor Fc es el receptor de activación Fc γ .

96. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 78, en donde dicho receptor Fc es el receptor Fc γ R11A.

97. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 73, en donde dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma P3X63 de ratón, una célula PER, una célula PER. C6 o una célula de hibridoma.

98. La célula huésped de la reivindicación 73, que comprende además al menos un polinucleótido transfectado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 y 35-41, y en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina humana.

99. La célula huésped de la reivindicación 73, en donde dicho al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III, está operablemente unido a un elemento promotor constitutivo.

100. La célula huésped de la reivindicación 99, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

101. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno que tiene oligosacáridos modificados en una célula huésped, dicho método comprende:

a. cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permiten la producción

de dicha molécula que se enlaza a antígeno, y que permite la modificación de los oligosacáridos presentes en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b. aislar dicha molécula que se enlaza a antígeno, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20, y en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno o fragmento de la misma es quimérica.

102. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparados con oligosacáridos no modificados.

103. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde dichos oligosacáridos modificados son híbridos.

104. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde dichos oligosacáridos modificados son complejos.

105. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde dicho anticuerpo recombinante o fragmento del mismo producido por dicha célula huésped tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la Región Fc de dicho polipéptido.

106. Un método de acuerdo con la reivindicación 105, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son híbridos.

107. Un método de acuerdo con la reivindicación 105, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son complejos.

108. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

109. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

110. Un método de acuerdo con la reivindicación 101, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

111. Una molécula que se enlaza a antígeno diseñada para tener función efectora aumentada producida mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 101-110.

112. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 111, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

113. Un anticuerpo diseñado para tener afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, producido mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 101-110.

114. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 113, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

115. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

116. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

117. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

118. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos.

119. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

120. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

121. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

122. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 111, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

123. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 113, en donde dicho receptor es el receptor Fc receptor es el receptor que activa Fc.

124. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 113, en donde dicho receptor Fc es el receptor FcγRIIIa.

125. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 101 a 110, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo que contiene la Región Fc, y diseñado para tener función efectora aumentada.

126. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 101 a 110, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la SEQ ID NO:1 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

127. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 101 a 110, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido

que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQID No : 70; y SEQ ID No : 72, y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

128. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 101 a 110, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO:3 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

129. Una molécula que se enlaza a antígeno producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 101 a 110, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 76 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada.

130. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 111 a 129 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

131. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 125 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

132. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 126 a 129 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

133. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 que

comprende además una secuencia que codifica una región constante de cadena ligera o pesada de anticuerpo humano.

134. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia con al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 24, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

135. Un célula huésped que coexpresa un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 134 y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la región variable de una cadena ligera de anticuerpo.

136. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

137. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

138. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

139. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 80% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

140. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 90% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

141. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

142. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 57, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

143. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

144. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 57, en donde al menos 75% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

145. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

146. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 145, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 31.

147. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 145, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 55.

148. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 145, en donde dicho polinucleótido aislado comprende la SEQ ID NO: 59.

149. Un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No: 75.

150. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 145 o 146, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

151. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 56; y SEQ ID NO: 60; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 76

152. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No: 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

153. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 75, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

154. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

155. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 85% de identidad a la SEQ ID No: 75.

156. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No: 29; SEQ D No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43;

SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

157. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad a la SEQ ID No: 75.

158. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

159. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 95% de identidad a la SEQ ID No: 75.

160. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No : 59; SEQ ID No : 61; SEQ ID No : 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No : 69; y SEQ ID No : 71.

161. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 99% de identidad a la SEQ ID No: 75.

162. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40;

SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72 ; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

163. Un polinucleótido aislado que comprende

a) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID No: 76; y

b) una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una Región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

164. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72.

165. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No: 76.

166. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72.

167. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la SEQ ID NO : 76.

168. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 145-167.

169. El vector de la reivindicación 168, en donde dicho vector es policistrónico.

170. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 168.

171. Una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 145-167.

172. Un polipéptido humanizado que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID NO : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72, o una variante de la misma.

173. Un polipéptido humanizado que comprende la secuencia de SEQ ID NO : 76, o una variante de la misma.

174. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente de la SEQ ID No : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No : 60; SEQ ID No : 62; SEQ ID No : 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No : 70; y SEQ ID No : 72, o una variante de la misma.

175. Un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO : 76, o una variante de la misma.

176. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 174-175, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

177. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el polipéptido aislado de la reivindicación 176.

178. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 177, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

179. El anticuerpo de la reivindicación 178, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

180. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 177, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

181. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 180, en donde dicho fragmento de anticuerpo es humanizado.

182. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 177, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo recombinante.

183. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 182, en donde dicho anticuerpo recombinante es humanizado.

184. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 177, en donde dicho anticuerpo recombinante comprende una Región Fc humana.

185. La molécula que se enlaza a antígeno of reivindicación 184, en donde dicha Región Fc humana es una Región Fc de IgG humano.

186. Una molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 177-185, dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene una Región Fc con oligosacáridos modificados.

187. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde dicha Región Fc ha sido modificada para tener residuos de mucosa reducidos comparados con molécula que se enlaza a antígeno no modificada.

188. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde dicha Región Fc tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados.

189. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde dichos oligosacáridos modificados son bisecados complejos.

190. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde dichos oligosacáridos modificados tienen una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados no fucosilados en la Región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno.

191. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 190, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son híbridos.

192. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 190, en donde dichos oligosacáridos bisecados, no fucosilados son complejos.

193. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 20% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

194. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 30% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

195. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la

reivindicación 186, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

196. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

197. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 de murina para enlazarse a CD20 humano, y en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es quimérica; dicho método comprende

a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 173 o reivindicación 174 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha molécula que se enlaza a antígeno; y

b) recuperar dicha molécula que se enlaza a antígeno.

198. El método de la reivindicación 197, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

199. El método de la reivindicación 197, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno quimérica es humanizada.

200. Una composición farmacéutica que comprende la molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 186-196 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

201. La composición farmacéutica de la reivindicación 200, en donde dicha composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

202. La composición farmacéutica de la reivindicación 200, en donde dicha composición comprende además un adyuvante.

203. Una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido

nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de un polipéptido producido por dicha célula huésped, en donde dicho polipéptido es una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 177-194.

204. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

205. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo.

206. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un fragmento de anticuerpo.

207. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región equivalente a la Región Fc de un IgG humano.

208. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada como resultado de dicha modificación.

209. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped exhibe función efectora aumentada como resultado de dicha modificación.

210. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 204, en donde dicho polipéptido de fusión comprende el dominio catalítico de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III.

211. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 204, en donde dicho polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

212. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 211, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II.

213. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 211, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I.

214. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 211, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II.

215. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 211, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa I.

216. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 211, en donde dicho dominio de localización Golgi es el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo $\alpha 1-6$.

217. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada.

218. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células NK.

219. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a macrófagos.

220. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es enlace aumentado a células polimorfonucleares.

221. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora es enlace aumentado a monocitos

222. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

223. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es maduración de célula dendrítica aumentada.

224. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 209, en donde dicha función efectora aumentada es copiado de célula T aumentado.

225. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 208, en donde dicho receptor Fc es el receptor que activa Fcγ.

226. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 208, en donde dicho receptor Fc es receptor FcγRIIIA.

227. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 203, en donde dicha célula huésped es una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma P3X63 de ratón, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma.

228. La célula huésped de la reivindicación 203, que comprende además al menos un polinucleótido transfectado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 y 35-41, y en donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina humana.

229. La célula huésped de la reivindicación 203, en donde dicho al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, está operablemente unido a un elemento promotor constitutivo.

230. La célula huésped de la reivindicación 229, en donde dicho polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III es un polipéptido de fusión.

231. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 189, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

232. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

233. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

234. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 80% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

235. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 90% de los oligosacáridos en la Región Fc son bisecados.

236. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 50% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

237. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 60% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

238. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 70% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

239. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 186, en donde al menos 75% de los oligosacáridos en la Región Fc son no fucosilados.

240. Un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

241. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 240, en donde dicha región determinante de complementariedad se selecciona del grupo consistente de: [LISTA TOTAL DE LAS SECUENCIAS DE CDR DE B-Ly1].

242. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 240, en donde dicho polinucleótido aislado codifica una molécula que se enlaza a antígeno.

243. Un polinucleótido aislado que comprende al menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

244. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 243, en donde dichas regiones determinantes de complementariedad comprenden al menos una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6 y SEQ ID NO : 7; y al menos una secuencia seleccionada del grupo consistente de: SEQ ID NO : 21, SEQ ID NO : 22, y SEQ ID NO : 23; y la SEQ ID NO : 24, o formas variantes o truncadas de dichas secuencias que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

245. Un polipéptido aislado codificado por los polinucleótidos aislados de cualquiera de las reivindicaciones 240-244.

246. Una molécula que se enlaza a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o una forma variante o troncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de complementariedad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprende además una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo.

247. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 246, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende al menos tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 de murina, o formas variantes o truncadas del mismo, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad.

248. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 247, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo.

249. Una molécula que se enlaza a antígeno de acuerdo con la reivindicación 247, en donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado.

250. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado que tienen ADCC aumentada como resultado de tal diseño sin pérdida sustancial de habilidad para inducir apoptosis de células objetivo.

251. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 250, en donde dicho anticuerpo ha sido diseñado para tener un patrón alterado de glicosilación en la Región Fc.

252. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 251, en donde dicha glicosilación alterada es un aumento en la cantidad de oligosacáridos bisecados complejos.

253. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 251, en donde dicha glicosilación alterada es una disminución en la cantidad de residuos de fucosa.

254. Un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado de acuerdo con la reivindicación 250, en donde dicho anticuerpo ha sido diseñado para tener una secuencia de amino ácido alterada en la Región Fc.

Listado de Secuencias

234

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

<120> Moléculas que se enlazan a antígeno con Afinidad de enlace al
 Receptor Fc aumentada y Funcion Efectora

<130> 1975.0290001

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<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

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 2

ggacctgaac tgggtgaagcc tggggcctca gtgaagattt cctgcaaagc ttctggctac 60

237

gcattcagtt actcttggat gaactgggtg aaactgagggc ctggacaggg tcttgagtgg 120
 attggacgga ttttctctgg agatggggat actgactaca atgggaaatt caagggcaag 180
 gccacactga ctgctgacaa atcctccaac acagcctaca tgcaactcac cagcctgacc 240
 tctgtggact ctgcggtcta tttatgtgca agaaatgtct ttgatgggta ctgggtagtt 300
 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 336

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<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
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 4
 aatccagtca ctcttggaaac atcagcttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta 60
 catagtaatg gcatcactta tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120
 ctcttgattt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacagggtt cagtagcagt 180
 gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 240
 tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacgttcg gagggggggac caagctggaa 300

ataaaacgg

309

236

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

<400> 5
 tactcttgga tgaac

15

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 6
 ggctacgcat tcagttac

18

<210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 7
 ggctacgcat tcagttactc ttggatgaac

30

<210> 8
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 8
 aggtctagta agagtctcct acatagtaat ggcatcactt atttgtat

48

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 9
 cagatgtcca accttgtctc a

21

<210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 10
 gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg

27

<210> 11
 <211> 1407
 <212> ADN

1234

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cADN quimérico de ratón-humano

<400> 11

atggggttgga gcctcatctt gctcttcctt gtcgctggtg ctacgcgtgt cctgtccgag	60
gtcaagctgc agcagtctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc	120
tgcaaagctt ctggctacgc attcagttac tcttgatga actgggtgaa actgaggcct	180
ggacaggggtc ttgagtggat tggacggatt tttcctggag atggggatac tgactacaat	240
gggaaattca agggcaaggc cacactgact gctgacaaat cctccaacac agcctacatg	300
caactcacca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tatgtgcaag aaatgtcttt	360
gatggttact ggtagttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagctagc	420
accaagggcc catcggtctt cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggc gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gccc aaatct	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga	1407

<210> 12

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

237

240

<223> cADN quimérico de ratón-humano

238

<400> 12

```

atgggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
agaggagaca ttgtgctcac ccaaactaca aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg 180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgtc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaatctt agaacttccg 360
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

```

<210> 13

<211> 468

<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

```

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

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

<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

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

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

<400> 15

Tyr Ser Trp Met Asn
1 5

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

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

242

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn
1 5 10

<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

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21

<211> 51

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 21

cggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c

51

<210> 22

<211> 24

245

<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 22
tttcctggag atggggatac tgac

24

243

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

<400> 23
cggatttttc ctggagatgg ggatactgac

30

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

<400> 24
aatgtctttg atggttactg gttagtttac

30

<210> 25
<211> 17
<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
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

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

<400> 27

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5 10

246

244

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

<400> 28

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
 1 5 10

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

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

<400> 29
 cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcccgata caccttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

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

<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

247

65

70

75

80

245

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> 31

<211> 357

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 31

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<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
50 55 60

248

246

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
<213> Artificial

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

<400> 33
cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcctcagct 360
agcacc 366

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

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

<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

249

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

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

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

<400> 35
cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tctccggata cgcgttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

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

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

<400> 37
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgcgttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcg 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

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

<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

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
<212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 39
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tcaattgggt gcggcaggcg 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 tggtcaccgt ctctca 357

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

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

<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
<212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 41
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgcctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggga tctcgtgggt gcggcaggcg 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcccaga aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

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

250

253

251

<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

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 43

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgccctc agtgaaggctc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttccc gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

254

252

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<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

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttggg tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttccc gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacctc ctctca 357

<210> 46

253

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

293

<220>
 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano
 <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
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 47
 cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgtctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

256

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

254

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

<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
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 49

gaggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcagagaaat tccaagggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca 357

255

<210> 50
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 51

gaggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttggg tgaactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

256

aatgggaaat tcaaggggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 53
 cagatgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

tctctgaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctcttcagct 360
 agcacc 366

<210> 54
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 55
 gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcggggc cctgcgggctc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttggg tgaactgggt gcggcaggct 120
 cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 56
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<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
 <212> ADN

258

267

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 57

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgcatte agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgga agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attacgccg 300
acaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de ratón-humano

<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

259

262

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

260

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

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

<400> 59
cagggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcgggctc cctgcgggctc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt ggggcaggct 120
cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacctg ctctca 357

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

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

<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

262

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

261

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

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

<400> 61
cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

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

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

<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

269

262

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> 63
<211> 456
<212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 63
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtcga gtctggagga ggcggtgtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

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

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

<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

265

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

263

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> 65
<211> 456
<212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 65
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtcga gtccggagga ggcttgaaga 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

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

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

<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

264

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> 67
<211> 456
<212> ADN
<213> Artificial

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

<400> 67
cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggctc ttccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgga agggcctcga gtgggtggga cggatcttct 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

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

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

267

265

<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 cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

268

266

<210> 70
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 70

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

Ser Leu Arg Val 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> 71
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 71

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

267

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 72
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico de ratón-humano
 <400> 72

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 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
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 74
 <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

<210> 75

<211> 345

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN quimérico de ratón-humano

<400> 75

gatatcgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gcccgccagc 60

attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatcactta ttgtattgg 120

tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctcttgattt atcaaatgtc caaccttgtc 180

tctggcgtcc ctgaccggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcaggggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcy ctcagaatct agaacttcct 300

tacaccttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cgggtg 345

<210> 76

<211> 115

<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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

268

271

269

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
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 77
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggctctcctgc tgcctctgggtt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

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

<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

272

	Enlazante	Inicio de la SEQ ID No 1 (amino ácido) y la SEQ ID No.2 (nucleótido)	
1	GAGGTCAAGC TCCAGCAGTC T	GGAAGCTGAA CTGGTGAGC CTGGGGCCCTC AGTGAAGATT TCCTGCAGAG CTCTGGCTCA GGCATTCACT TACTCTTGGG CTCCGTTTC AGGTGGTCAG A	CTGGAGCTT GAGGACTTC GAGCCCGGAG TCAGTCTTAA AGGACGTTT GAGGACCGAT GCGTAGTCA 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 F S Y S W B-Ly1 vh
101	TGAAGTCGCT GAAAGTGAAG CTTGGACAGG GTCTTGAGTG GATGGAGCG ATTTTCTCTG GAGTGGGGA TACTGACTAC AATGGGAAT TCAGGGGCA ACTTGACCA CTTGACTCC GAGCTGTTCC CAGGACTCAC CTAGCTGCC TAAAGAGAC CTCTACCGCT ATGACTGATG TTACCTTTA AGTTCGCTT M N W V K L R P G Q G L E W T Q R I F P G D G D T D Y N G K F K G B-Ly1 vh		
201	GAGGACAGC ACTGCTGACA AATGCTGCA CACAGGCTAC ATGCAACTCA CAGGCTGAC CTCTGTGAGC TCTGCGTCT ATTATGTC AGAAATGTC CGGTGTGAC TGAGGACTGT TTGAGAGTT GTGCGGAG TGAGTTGAGT GGTGGAGCTG GAGACAGCTG AGAGCGGGA TAATACAG TTCTTACAG 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	TTGATGCTT ACTGTTGAGT TTACTGGGC CAGGGAGTC TGCTACTGT CTCTGCA AACTACCA TGACCATCA AATGACCGG GTTCCCTGAG ACCAGTACA GAGCTT F D G Y W L V Y R G Q G T L V T V S A B-Ly1 vh		

FIG 1

273

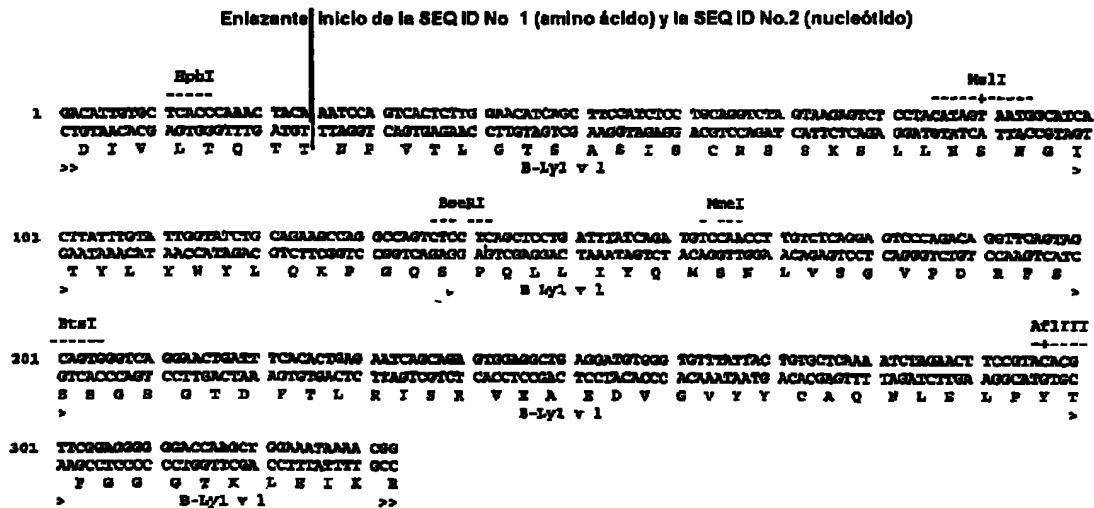


FIG. 2

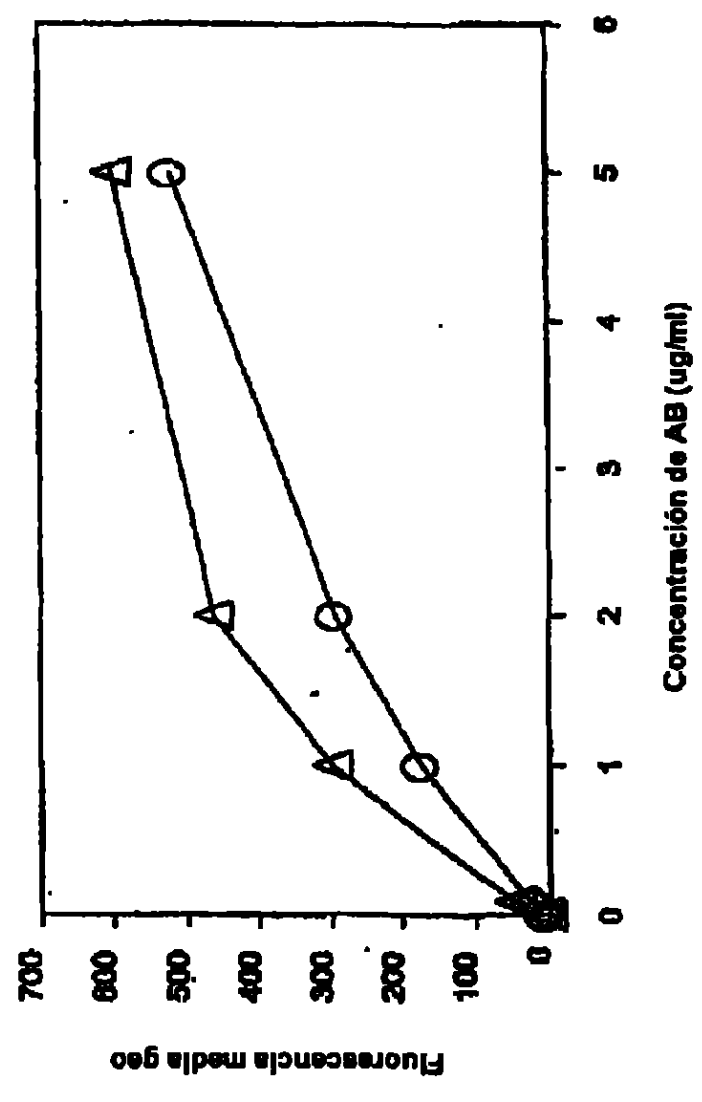


FIG.3

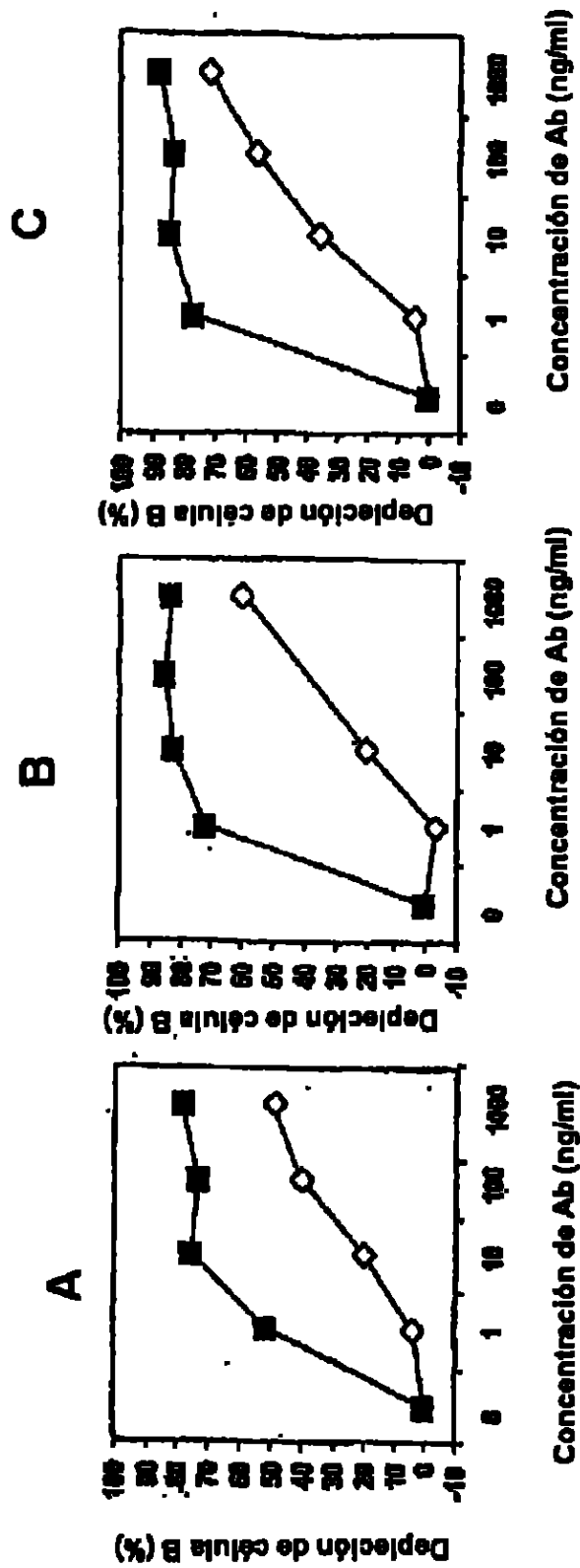


Fig 4

SEQ ID No:11 (Acids nucleica) y
SEQ ID No:13 (amino acids)

501 CAGGAGTAC TTGCGGAC GGTGACGCT GTCTGACAC TCGAGCGCC TACCGGCGS GTTGCACAC TTGCGGCTG TCTTACGATC CTGCGGACAC
GTCTCTGATG AAGGGCTTG GCTACGACCA GAGGAGCTG AGTCCGCGS ACTGTGCTC GAGCTGTGCG AAGGCGGAC AGGAGTCTAC GAGTCTCTGAG
Y K D Y P P E P V T V E W W E G A L T G Q V E T F P A V L Q S S G L
>.....B-Ly1 h.c.....>

501 TACGCTGCA GCGAGCTGT GAGCTGCTC TCGAGGACCA GAGCTGAC TCGAGCTGCA ATCGAGGAC CAGGAGGAC CAGGAGGAC AAGGAGGACCA
AAGAGGAGT GTTCGACCA GTTCGCGCG AGTCTGCTG ACTGCTGCTG CTGAGTCTG AAGTCTGACT TACGCTGCG GTGCTGTGCG TTGCTGCTGT
Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C W V E E E S E T E V D
>.....B-Ly1 h.c.....>

701 AAGAGGACCA GCGGAGTCT TGTGACGAA GTTACGCTG GCGAGCTG CCGAGCTG GAGGAGCTG GAGGAGCTG GAGGAGCTG TCGCGGACCA
TCTTCTGCT GTGCTGCTG ACGAGTCTT GAGTGTGAC GTTGTGCGS GTTGTGCGS TGTGCGAC CCGTGTGCT CAGAGGAGCA AAGGAGTCTT
X K A E P E S C D E T X T C P F C P A P E L L G Q P S Y P L P P P
>.....B-Ly1 h.c.....>

801 ACGGAGGAC AGCTGCTGCA TCGCGGAC CCGTGTGCT AGTGTGCGS TGTGCTGCT GAGGAGGAC GAGGAGGAC TCGAGTCTG CTGCTGCTG
TGTGCTGCTG TGTGCTGCT GAGGAGGAC TGTGCGAC AGCGCTGCA CCGAGTCTG CTGCTGCTG CTGCTGCTG AAGTGTGCT GAGGAGGAC
K P K D T L M I S M T P E V T C V V V D V S E S P E V X F E W Y V
>.....B-Ly1 h.c.....>

901 GAGGAGGAC AGCTGCTGCA TCGCGGAC AGTGTGCTG AAGAGGACCA CAGGAGGAC TCGCTGTGCG TCGCTGTGCT CAGGCTGCTG CAGGAGGAC
CTGCGGAC TCGCTGTGCT AGCTGTGCT TTGCGCTC TCGCTGTGCT TCGCTGTGCT GTTGTGCGS ATGCGGACAG AGTGTGCGS GTTGTGCTG
D G V E V R E A E T K P M E E Q E N S T Y E V V S V L T V L R Q D
>.....B-Ly1 h.c.....>

1001 GAGGAGGAC CAGGAGGAC AAGTGTGCG TGTGAGCA AGCTGCTG GAGGAGGAC AAGAGGACCA CCGAGGAC AAGGAGGAC AAGGAGGAC
CGAGGAGGAC GTTGTGCGS TGTGCGAC AAGGAGGAC TCGAGGAGT CCGAGGAC TCGTGTGCA GAGGAGGAC GTTGTGCGS GTTGTGCGS
W L M G E E Y E C K V S M K A L P A P T E E T X S K A E Q Q P E E
>.....B-Ly1 h.c.....>

FIG. 5B

Seq1

1101 ACGGCGGAC AGCGCGGCGG CAGCGCGGAC TCGCGCGGAC AGCGCGGCGG TCGCGCGGAC CAGCGCGGAC AGCGCGGCGG CAGCGCGGAC
TCGCGCGGAC TCGCGCGGAC CAGCGCGGAC AGCGCGGCGG TCGCGCGGAC CAGCGCGGAC AGCGCGGCGG TCGCGCGGAC CAGCGCGGAC
P Q V Y T L P E S R D B L T E N Q V B U T C L V X G Y Y P S D I A V
>.....>> B-Ly1 h.c.....>

1201 CAGCGCGGAC AGCGCGGCGG CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC
CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC
E W E S M C Q P B W N Y X T Z P P V L D S D G S F T L Y E K L T V
>.....>> B-Ly1 h.c.....>

Seq2

1301 ACGGCGGAC AGCGCGGCGG CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC
TCGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC CAGCGCGGAC
D E B R N Q Q G N V F S C A V N X E A L E B E Y F Q E L E L S F
>.....>> B-Ly1 h.c.....>

1401 TAAAGGA
ATTTCCT
G K -
>.....>> B-Ly1 h.c.....>

SEQ ID No:11 (same nucleotide) Y
SEQ ID No:13 (same nucleotide)

FIG. 5C

279

A

CDR1(Kabat): TACTCTTGGATGAAAC TyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 15
CDR1(Chothia): GGCTACGCATTTCAGTTAC GlyTyrAlaPheSerTyr	SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 16
CDR1(AbM): GGCTACGCATTTCAGTTACTCTTGGATGAAAC GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 17
CDR2(Kabat): CCGATTTTTCCTGGAGATGCGGATACTGACTACAAAGGAAATTCAGGGC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 25
CDR2(Chothia): TTTCTGGAGATGCGGATACTGAC PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 26
CDR2(AbM): CCGATTTTTCCTGGAGATGCGGATACTGAC ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 27
CDR3(Kabat, Chothia, AbM): AATGTCTTTGATGGTTACTGGTTAGTTTAC AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 28

B

CDR1(Kabat): AGGTCTAGTAAGAGTCTCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTAT ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 18
CDR2(Kabat): CAGATGTCCAACCTTGTCTCA GlnMetSerAsnLeuValSer	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 19
CDR3(Kabat): GCTCAAAATCTAGAACTTCCGTACACG AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr	SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 20

FIG. 7

1 Porcentajes Relativos

	• EndoH	
	Elly-1 ml	Elly-1 ml
	031024	031024
	016	017
1053		
1286		
1282		
1286		3.70%
1339	18.60%	17.80%
1480		4.30%
1486	5.80%	5.80%
1802	5.10%	3.70%
1843	36.00%	38.20%
1822		
1847	4.80%	3.00%
1884	7%	
1888		
1888	11.00%	10.30%
1706	7.20%	7.30%
1810		
1828		
1830	5.80%	6.20%
1972		
2012		
	100%	100%

FIG. 8A

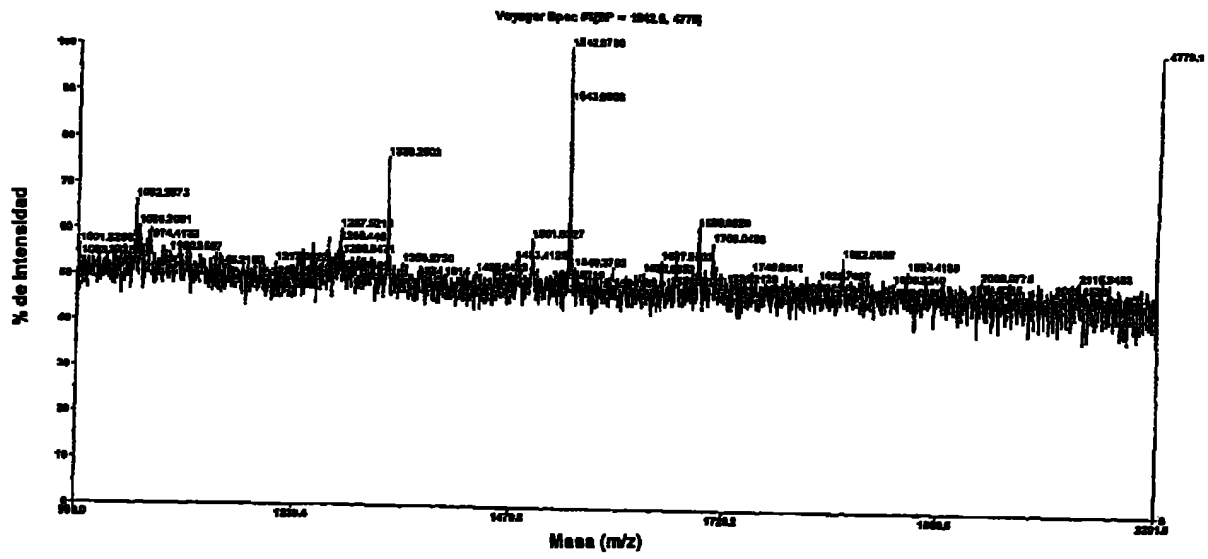


FIG. 8B

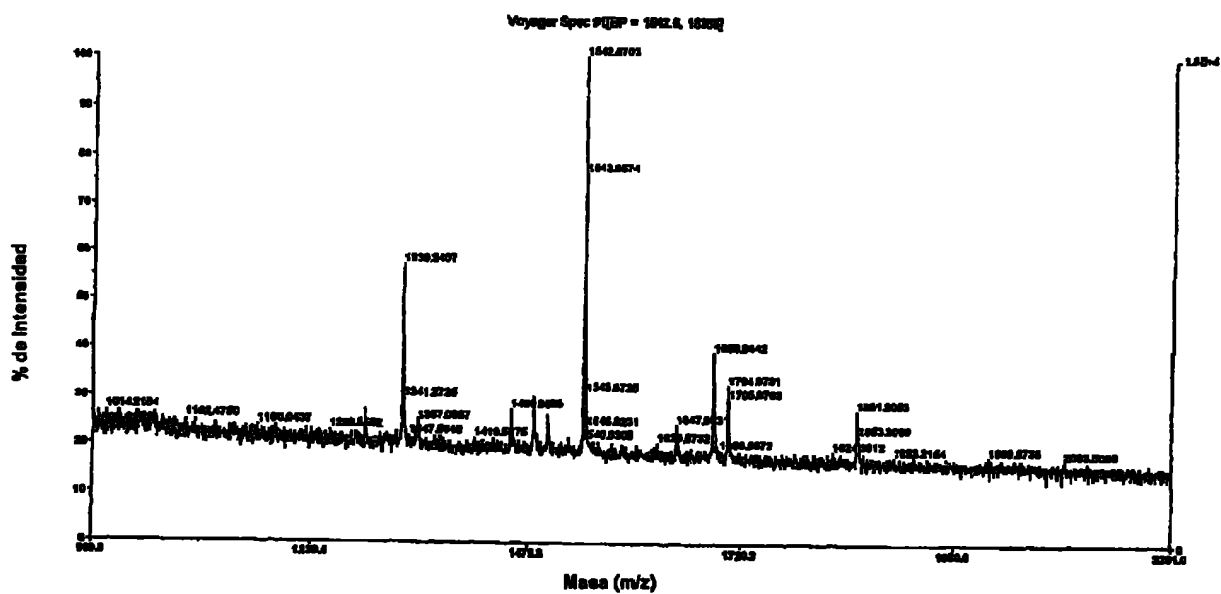


FIG 8C

Figura 9

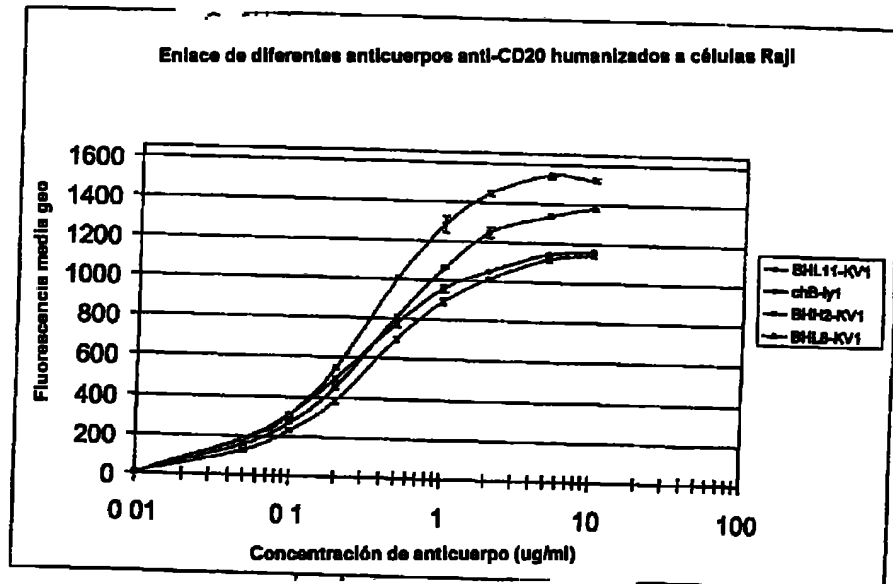
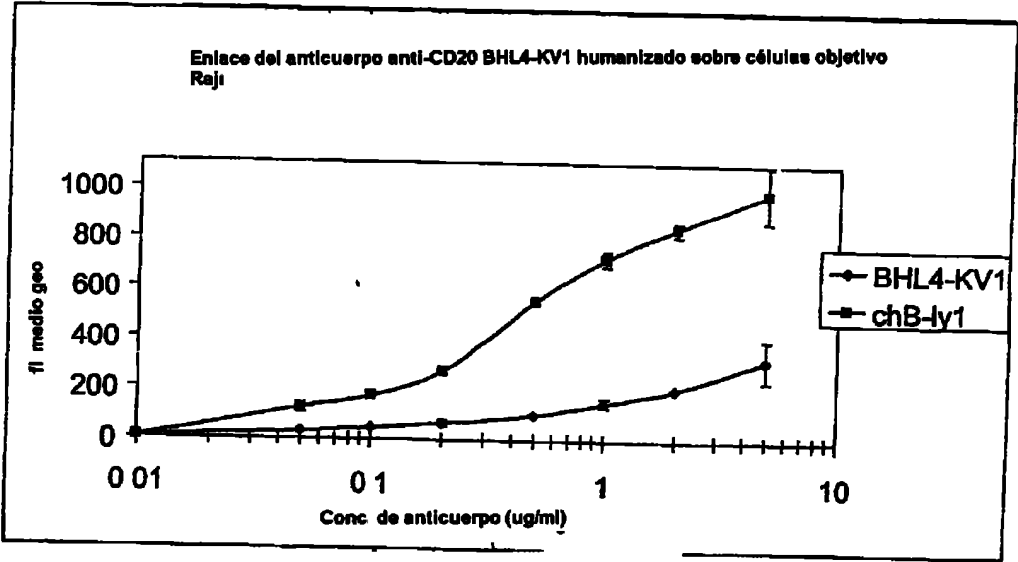


Figura 10

284



282

Figura 11

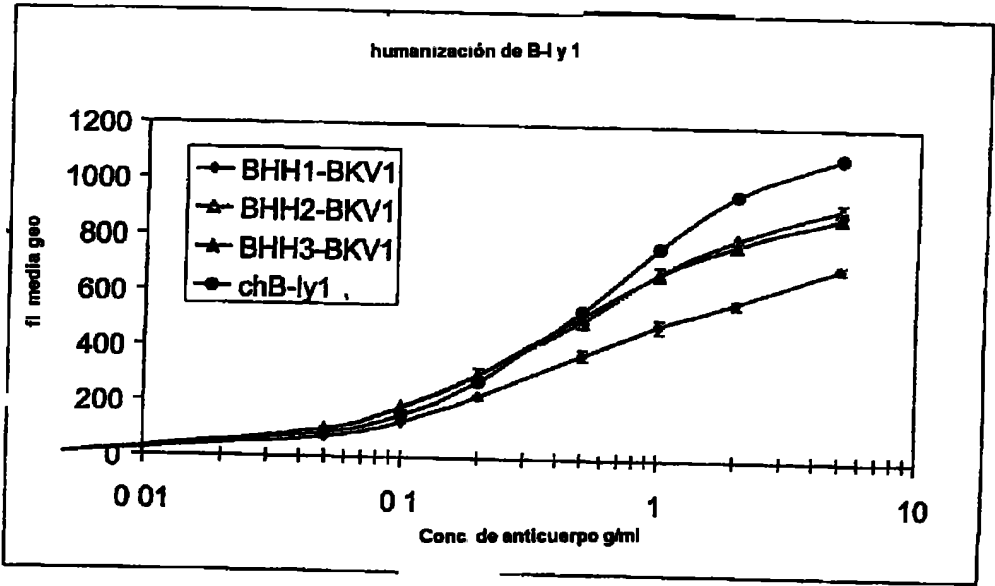


Figura 12

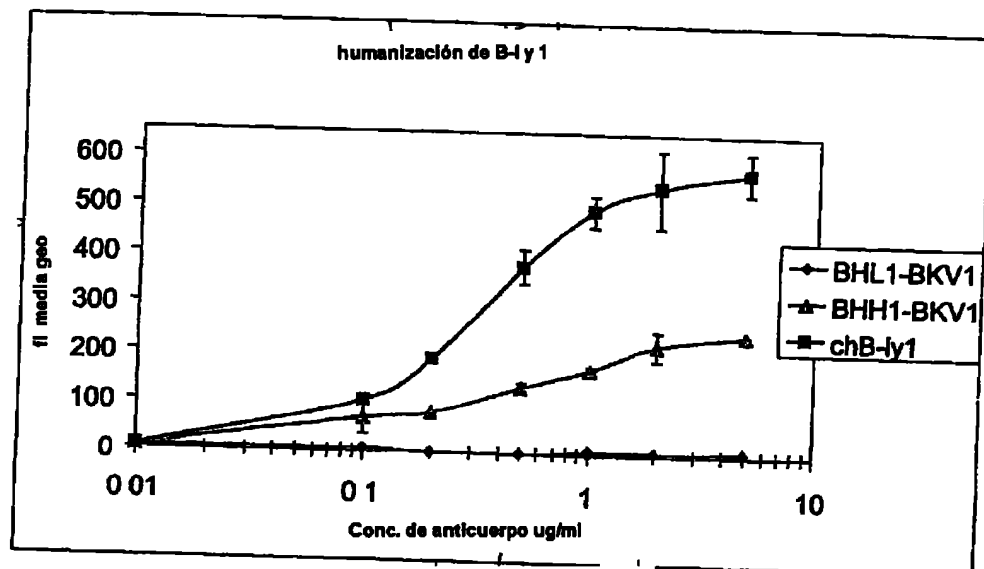


Figura 13

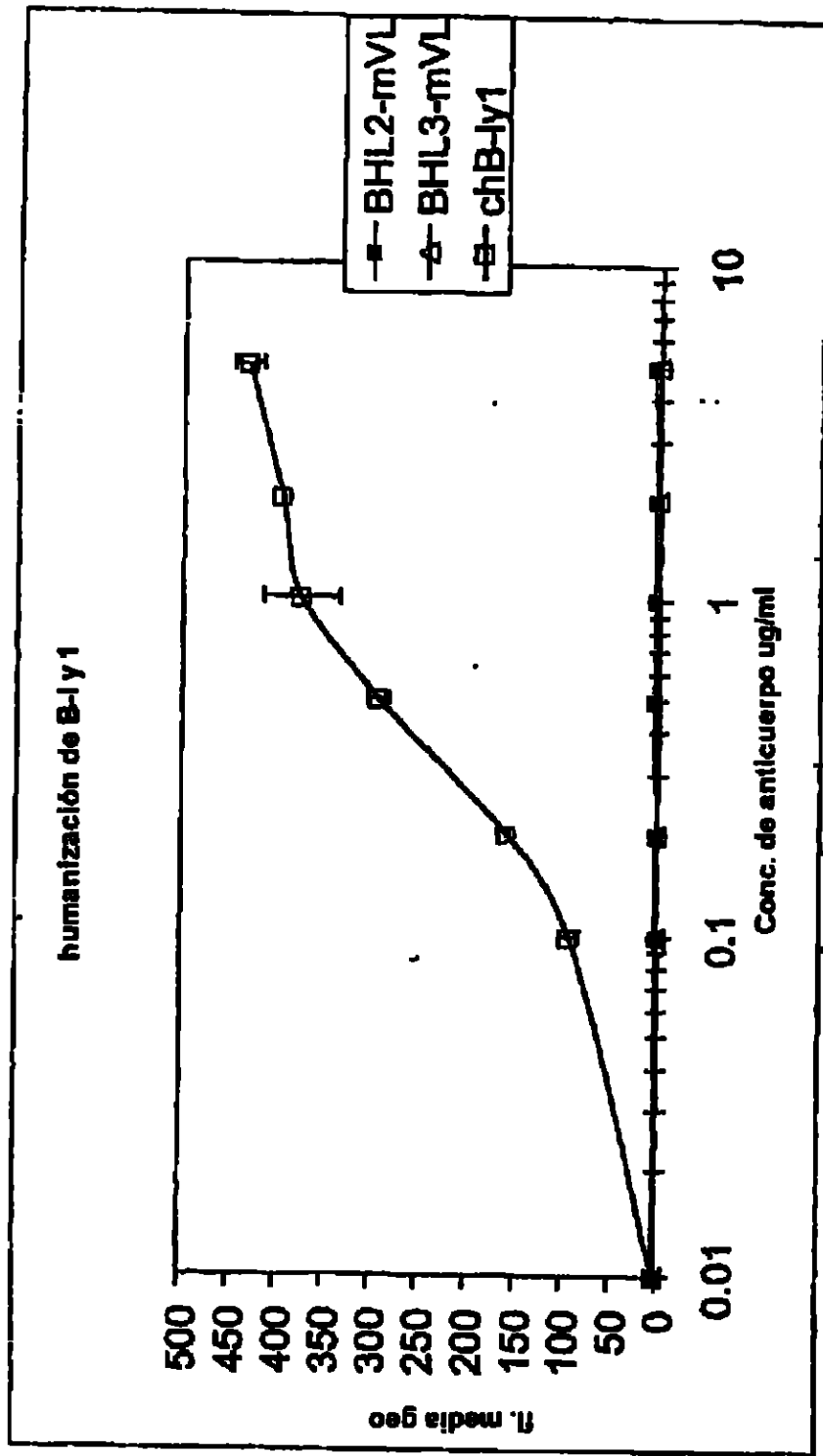
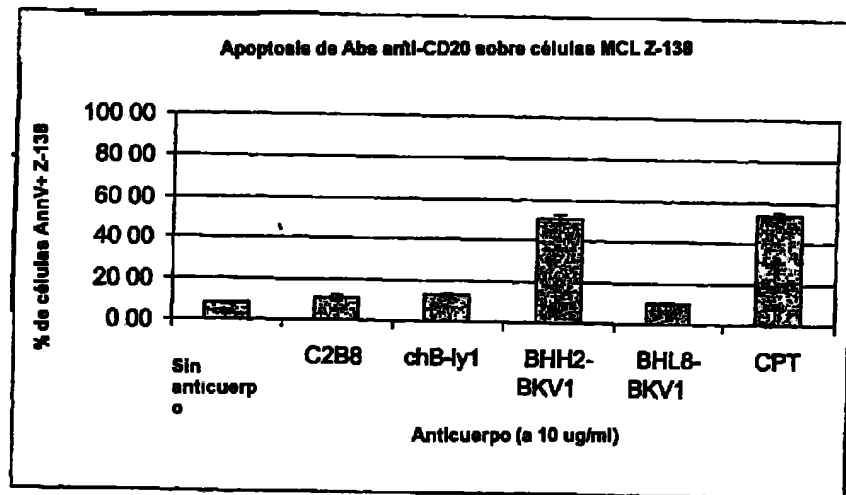


Figura 14



^

462

Figura 15

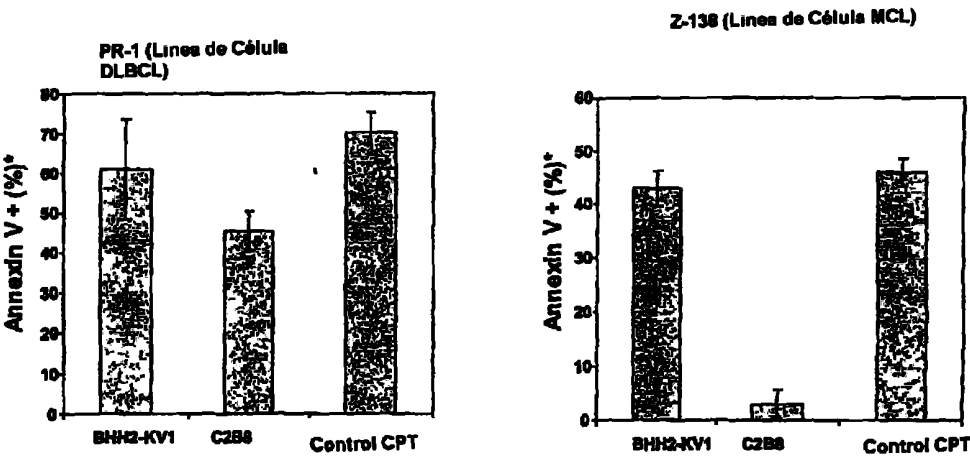
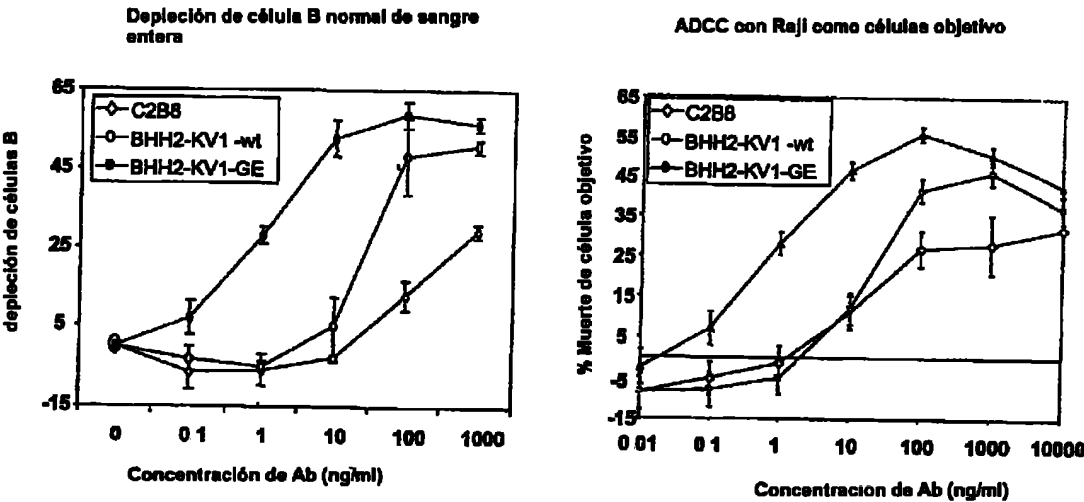


Figura 16



442

Mass spectrum of compound 10b. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 50 to 250. The y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 167.007. Other labeled peaks include:

m/z	Relative Intensity (%)
108.103	~5
128.393	~5
136.376	~5
137.433	~5
138.443	~5
140.453	~5
141.463	~5
142.473	~5
143.483	~5
144.493	~5
145.503	~5
146.513	~5
147.523	~5
148.533	~5
149.543	~5
150.553	~5
151.563	~5
152.573	~5
153.583	~5
154.593	~5
155.603	~5
156.613	~5
157.623	~5
158.633	~5
159.643	~5
160.653	~5
161.663	~5
162.673	~5
163.683	~5
164.693	~5
165.703	~5
166.713	~5
167.007	100
168.723	~5
169.733	~5
170.743	~5
171.753	~5
172.763	~5
173.773	~5
174.783	~5
175.793	~5
176.803	~5
177.813	~5
178.823	~5
179.833	~5
180.843	~5
181.853	~5
182.863	~5
183.873	~5
184.883	~5
185.893	~5
186.903	~5
187.913	~5
188.923	~5
189.933	~5
190.943	~5
191.953	~5
192.963	~5
193.973	~5
194.983	~5
195.993	~5
196.003	~5
197.013	~5
198.023	~5
199.033	~5
200.043	~5
201.053	~5
202.063	~5
203.073	~5
204.083	~5
205.093	~5
206.103	~5
207.113	~5
208.123	~5
209.133	~5
210.143	~5
211.153	~5
212.163	~5
213.173	~5
214.183	~5
215.193	~5
216.203	~5
217.213	~5
218.223	~5
219.233	~5
220.243	~5
221.253	~5
222.263	~5
223.273	~5
224.283	~5
225.293	~5
226.303	~5
227.313	~5
228.323	~5
229.333	~5
230.343	~5
231.353	~5
232.363	~5
233.373	~5
234.383	~5
235.393	~5
236.403	~5
237.413	~5
238.423	~5
239.433	~5
240.443	~5
241.453	~5
242.463	~5
243.473	~5
244.483	~5
245.493	~5
246.503	~5
247.513	~5
248.523	~5
249.533	~5
250.543	~5
251.553	~5
252.563	~5
253.573	~5
254.583	~5
255.593	~5
256.603	~5
257.613	~5
258.623	~5
259.633	~5
260.643	~5
261.653	~5
262.663	~5
263.673	~5
264.683	~5
265.693	~5
266.703	~5
267.713	~5
268.723	~5
269.733	~5
270.743	~5
271.753	~5
272.763	~5
273.773	~5
274.783	~5
275.793	~5
276.803	~5
277.813	~5
278.823	~5
279.833	~5
280.843	~5
281.853	~5
282.863	~5
283.873	~5
284.883	~5
285.893	~5
286.903	~5
287.913	~5
288.923	~5
289.933	~5
290.943	~5
291.953	~5
292.963	~5
293.973	~5
294.983	~5
295.993	~5
296.003	~5
297.013	~5
298.023	~5

Figura 18

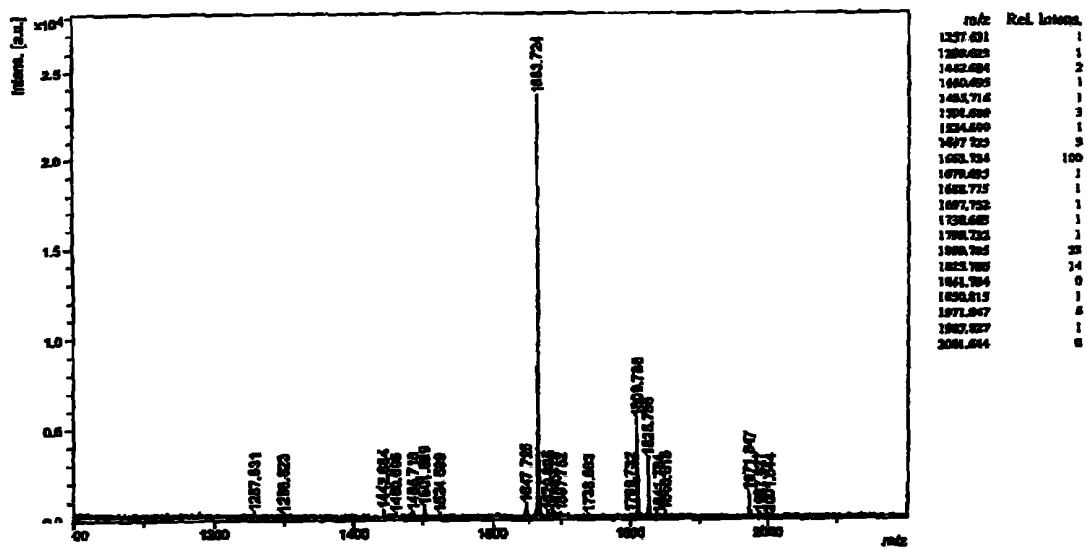


Figura 19

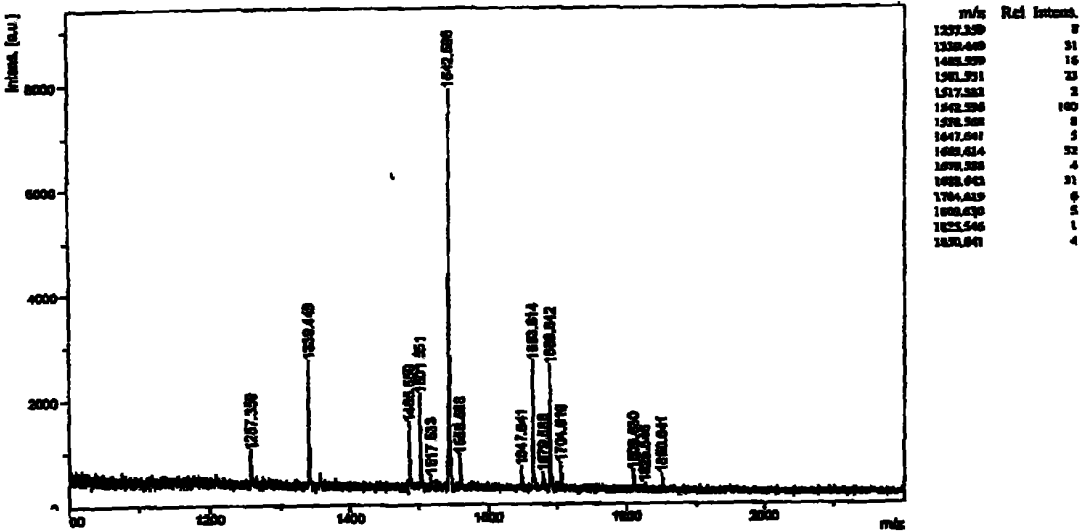
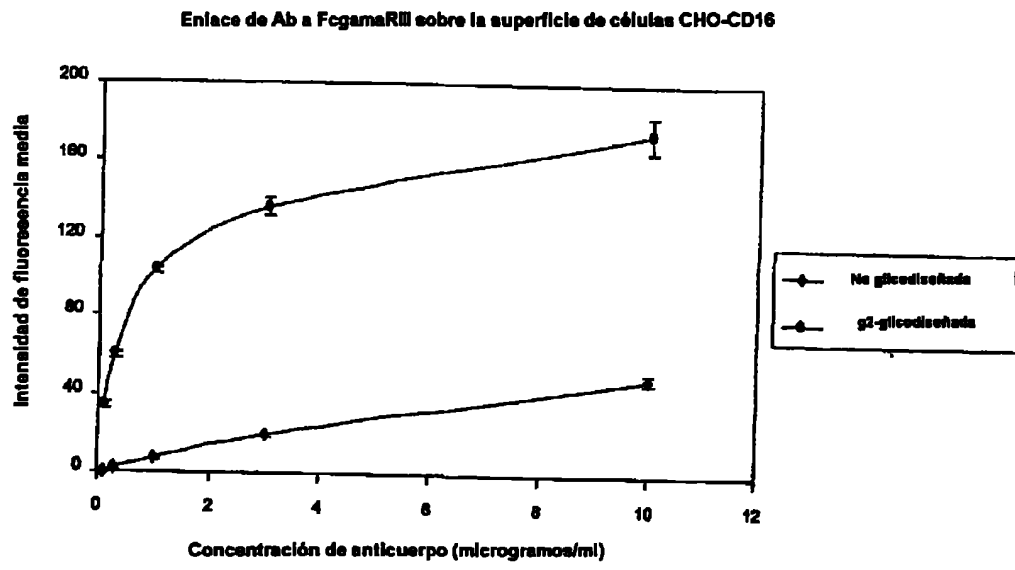


Figura 20

294

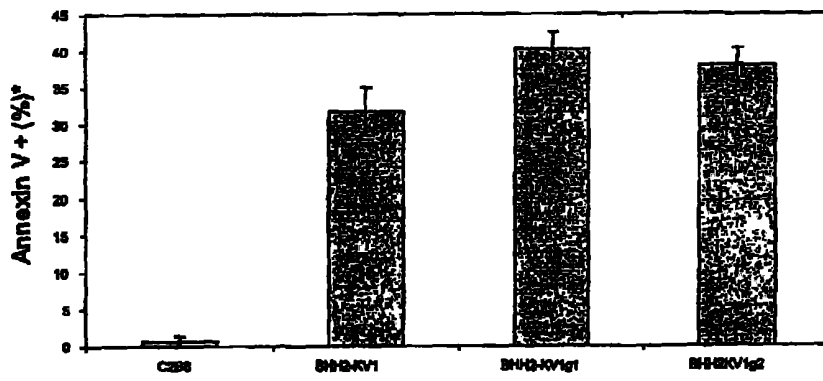


462

Figura 21

Apóptosis por Abs anti-CD20

Linea de células de linforma de células del manto Z-138



296

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ♦ Descripción de la invención [X] 97
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 273
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA ☒ [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha Mayo 25 de 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D. C., Colombia

297 ~~298~~
300

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 50457
	Solicitud internacional	IB2004/003896
	Fecha inicio fase nacional	05/06/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	-7 8791

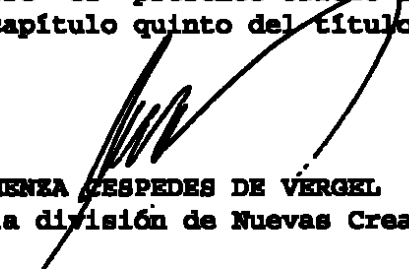
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA ESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 AGO. 2006
adpa11